

UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR *STREPTOCOCCUS*:
Estudo da Fermentação e Caracterização do Produto**

Christiane Saraiva Ogradowski, M Sc.
Autora

Maria Helena Andrade Santana, D Sc.
Orientadora

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas, 2006.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

Og7p Ogradowski, Christiane Saraiva
Produção de ácido hialurônico *Streptococcus*: estudo
da fermentação e caracterização do produto / Christiane
Saraiva Ogradowski.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Ácido hialurônico. 2. Fermentação. 3.
Estreptococ. 4. Viscoelasticidade. 5. Peso molecular. I.
Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. III. Título.

Título em Inglês: Production of hyaluronic acid by *Streptococcus*: study of the
fermentation and characterization of the product

Palavras-chave em Inglês: Hyaluronic acid, fermentation, *Streptococcus*,
Viscoelasticity, Molecular weight

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Silvia Yuko Eguchi, Ranulfo Monte Alegre, Jorge Alberto
Vieira Costa e Carlos Osamu Hokka

Data da defesa: 22/02/2006

Tese de Doutorado defendida por Christiane Saraiva Ogrodowski e aprovada em 22 de fevereiro de 2006 pela banca examinadora constituída pelos professores:

Dra. Maria Helena Andrade Santana

Dra. Silvia Yuko Eguchi

Dr. Ranulfo Monte Alegre

Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Dr. Carlos Osamu Hokka

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

Orientadora

Este trabalho é fruto do incentivo e amor que recebi principalmente de meus pais Raymundo e Lecy, minhas irmãs Danielle e Lucianne, cunhados Edmilson e Juliano, meu afilhado Matheus e de meu esposo Rodenei, a quem tanto amo.

Agradecimentos

A Professora Dr^a. Maria Helena Andrade Santana pela orientação, amizade e incentivo...

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Ribeiro do Departamento de Engenharia de Petróleo da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp pela utilização do reômetro.

Ao Físico Luiz Pompeo pelo realização das análises de viscosidade e viscoelasticidade.

Ao Professor Dr. José Augusto Rosário Rodrigues do Laboratório de HPLC e GPC do Instituto de Química da Unicamp pela utilização do HPLC.

Ao Técnico Ricardo Pereira pela realização das análises de concentração do AH.

Ao Professor Dr. César Costapinto Santana pela utilização do Laboratório de Propriedades Coloidais

Ao Professor Dr. Itamar Soares de Melo da EMBRAPA-Jaguariuna pela utilização do MEV.

À técnica Roseli pela realização das análises de morfologia das células.

Ao querido Professor Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela utilização do laboratório de tratamento de resíduos e pela sincera amizade.

Aos colegas de Laboratório Raquel, Elaine, Christine, Classius, Amós, Reinaldo e Gilson.

Ao CNPq e a Fapesp, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos familiares do meu esposo (D. Clara, irmãos, cunhados(as) e sobrinhos(as))
que me acolheram e me incentivaram nesta caminhada.

Aos amigos Eliane, Daniel, Mylene e Rodrigo pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Lucielen, Tatiane, Hélio, Beatriz, Machado, Camila, Otávio, Nelisa,
Gustavo, Rafael, Raquel, pela ajuda e incentivo nas horas difíceis.

A Deus pela força e iluminação em minha vida.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a produção de ácido hialurônico (AH) por via microbiana, correlacionando-se as variáveis do processo com a produtividade e propriedades do produto. Foram utilizadas cepas de *Streptococcus* em fermentações descontínuas, e buscou-se obter o AH de massa molar elevada, da ordem de milhões de Da, com alta viscosidade e viscoelasticidade. Essas propriedades são requeridas para as aplicações médicas do AH no tratamento de doenças degenerativas e inflamatórias das articulações dos ossos, na reposição do fluido sinovial e como veículo de liberação de fármacos em implantes cirúrgicos. Foram avaliadas três cepas de mutantes de *Streptococcus* (*S. equi*, ATCC 39506 e 6580, e *S. zooepidemicus* ATCC 39920), crescidas em meio de cultura composto de glicose, extrato de leveduras e sais. A maior produção do AH com alta viscosidade e viscoelasticidade foi obtida com a cepa ATCC 39920. O planejamento fatorial completo de experimentos 2^2 , foi utilizado para otimização do meio de cultura e indicou a maior produtividade para a razão mássica 1:1 entre as fontes de carbono (glicose) e nitrogênio (extrato de leveduras). O suprimento de oxigênio ao meio de cultura foi o principal fator para a produção do AH com as propriedades desejadas. A melhor produção foi 3,75 g/L, obtida a 2,0 vvm e agitação 150 rpm em 2,5 L de meio. O AH produzido apresentou viscosidade 913 cP, módulo elástico 73,1 Pa e massa molar $3,2 \times 10^6$ Da. O corte na alimentação de oxigênio causou despolimerização reduzindo a viscosidade e viscoelasticidade do AH. A determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio permitiu caracterizar o suprimento adequado de oxigênio ao longo da fermentação. Os resultados obtidos demonstram a potencialidade da produção do AH por fermentação submersa e contribuem para o entendimento dos mecanismos envolvidos na sua formação e polimerização.

ABSTRACT

This work studied the production of hyaluronic acid (HA) by microbial route correlating variables of the process with productivity and physico-chemical properties of the product. Strains of *Streptococcus* were used in batch fermentations, aiming to obtain HA with high molecular weight, in the range of millions, high viscosity and viscoelasticity. Those properties are requested for medical applications of HA in the treatment of degenerative and inflammatory diseases of joints, as well as in the replacement of the synovial fluid and as vehicle for drug delivery in surgical implants. Initially, the performance of three strains of mutants of *Streptococcus* (*S. equi*, ATCC 39506 and 6580, and *S. zooepidemicus* ATCC 39920), grown in medium of culture composed of glucose, yeast extract and salts were evaluated. The largest production of HA with viscous properties and viscoelasticity was obtained with the strain ATCC 39920. Secondly, a complete factorial planning of experiments 2^2 using the selected strain was performed aiming optimization of the culture medium. The largest productivity was obtained for 1:1 (w/w) ratio between the sources of carbon (glucose) and nitrogen (yeast extract). The supplying of oxygen to the culture medium was the limiting factor to the production of HA with the required properties. The best production obtained was 3.75 g/L, using 2.0 vvm and 150 rpm agitation in 2.5 L medium. The HA produced had viscosity 913 cP, elastic module 73.1 Pa and molecular weight 3.2×10^6 Da. The interruption in the feeding of oxygen reduced the viscosity and viscoelasticity of HA, due to depolymerization. The determination of the volumetric coefficient for oxygen transfer allowed to detect changes in medium along fermentation. The obtained results demonstrate the potentiality of the production of HA by submerged fermentation and also contribute to the understanding of the mechanisms involved in HA formation and polymerization.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
NOMENCLATURA.....	xviii
1.0. INTRODUÇÃO	1
2.0. OBJETIVO	4
3.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Ácido Hialurônico: Estrutura e Funções	5
3.2. Aplicações do Ácido Hialurônico.....	7
3.3. Fontes do Ácido Hialurônico.....	9
3.4. Requerimentos do Ácido Hialurônico para Aplicações Médicas	11
3.5. Biossíntese do Ácido Hialurônico	13
3.6. Estudos do Processo de Produção do Ácido Hialurônico.....	18
3.6.1. Cepas de <i>Streptococcus</i>	18
3.6.2. Condições Operacionais, Produtividade e Massa Molar	20
3.6.3. Meios de Cultura	22
3.6.4. Isolamento e Purificação do Ácido Hialurônico.....	23
3.7. Caracterização do Ácido Hialurônico.....	24
3.7.1. Massa Molar	24
3.7.2. Viscosidade e Viscoelasticidade.....	25
3.7.2.1. Viscosidade.....	25
3.7.2.2. Modelos matemáticos para fluídos puramente viscosos.....	27

3.7.2.3. Elasticidade.....	28
3.7.2.4. Viscoelasticidade Linear	29
3.8. Caracterização da Fermentação Submersa	32
3.8.1. Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio (k_{La}).....	32
4.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Processo Fermentativo - Produção de AH.....	36
4.1.1. Microrganismos	36
4.1.2 Manutenção e propagação do inóculo	36
4.1.3. Meio de fermentação	36
4.1.4. Separação do AH.....	37
4.2. Influência da Esterilização na Solução Polimérica.....	38
4.3. Seleção das Cepas.....	38
4.4. Influência da Relação das Fontes de Carbono e Nitrogênio – Planejamento Fatorial Completo 2 ²	38
4.5. Efeito da Adição de Lisozima	40
4.6. Efeito da Aeração Forçada	40
4.7. Variação nos Níveis da Aeração Forçada e Agitação.....	40
4.8. Corte da Aeração Forçada	41
4.9. Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio (k_{La}).....	41
4.10. Métodos Analíticos.....	42
4.10.1. Concentração do AH	42
4.10.1.1. Método Colorimétrico de Carbazol	42
4.10.1.2. HPLC	42
4.10.2. Concentração de Glicose	43

4.10.3. Concentração Celular	43
4.10.4. Densidade Ótica.....	43
4.10.5. Velocidade específica máxima de crescimento celular e fatores de rendimento $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$	44
4.11. Viscosidade Intrínseca.....	44
4.12. Massa Molar	45
4.13. Viscosidade e Viscoelasticidade.....	45
4.14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
4.15. Infravermelho	47
5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. Seleção da Cepa.....	48
5.1.1. Produção - parâmetros da fermentação	48
5.1.2. Separação e pré-purificação do AH.....	52
5.1.3. Verificação do AH intracelular.....	52
5.1.4. Caracterização reológica.....	52
5.1.4.1. Viscosidade.....	53
5.1.4.2 . Viscoelasticidade.....	57
5.1.4.3. Viscosidade Intrínseca.....	59
5.1.4.4. Massa Molar	60
5.2. Identificação Molecular do Produto	61
5.3 Efeitos da Esterilização	64
5.4. Influência das Concentrações das Fontes de Carbono e Nitrogênio na Produção de AH	65
5.4.1. Concentração celular	65
5.4.2. Concentração de hialuronato de sódio (NaAH).....	67

5.4.3. Viscosidade.....	68
5.5. Influência da Adição de Lisozima.....	69
5.6. Influência da Aeração.....	73
5.6.1. Comparação das fermentações com adição de lisozima e aeração forçada.....	78
5.7. Influência da Variação nos Níveis da Aeração Forçada e Agitação.....	79
5.7.1. Análise da fermentação	79
5.7.2. Análise do comportamento reológico.....	81
5.8. Requerimentos de Oxigênio e $k_L a$ ao longo da Fermentação.....	82
5.9. Efeitos da interrupção Corte da Aeração Forçada.....	85
5.10. Caracterização da Morfologia Celular e Presença do AH na Célula.....	88
6.0. CONCLUSÕES	91
7.0. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	94
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: (a) Fórmula espacial e molecular da unidade repetitiva dissacarídica, do Ácido Hialurônico, formada por ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil glicosamina (GlcNAc). (b) Polímero linear formado com N-unidades repetitivas dissacarídicas.	6
Figura 3.2: Células de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (bactéria gram-positiva) com suas cápsulas de ácido hialurônico em meio aerado.	11
Figura 3.3: Esquema da Biossíntese do Ácido Hialurônico.	14
Figura 3.4: Parede celular formada por polissacarídeos e peptídeos (peptidoglicano) nas bactérias gram positivas (<i>Streptococcus</i>)	16
Figura 3.5: Classificação dos fluidos puramente viscosos.	28
Figura 3.6: Espectro viscoelástico genérico envolvendo G'' (●●●), G' (+++) e η^* (***) de estruturas coloidais típicas, nas formas de: a) gel; b) solução concentrada; c) solução diluída	32
Figura 3.7: Variação da concentração de O_2 dissolvido com o tempo (Método dinâmico)	33
Figura 5.1: Perfis da produção de AH (a), consumo de glicose (b) e crescimento celular (c) para as cepas: <i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920, <i>S. equi</i> ATC 39506 e <i>S. equi</i> ATCC 6580, cultivadas em frascos de Erlenmeyer à temperatura de 37°C, pH _{inicial} 7,5 e meio de cultura com composição descrita na Tabela 4.1, item 4.1.3.	49
Figura 5.2: Perfil logarítmico do crescimento celular para as cepas: <i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920, <i>S. equi</i> ATC 39506 e <i>S. equi</i> ATCC 6580.	50
Figura 5.3: Comportamento reológico (a) viscosidade de cisalhamento e (b) tensão de cisalhamento, ambas em função da taxa de cisalhamento (curvas sobrepostas) para a solução de AH produzido pela cepa ATCC 39920 e para o padrão.	53

Figura 5.4: Comportamento reológico (a) viscosidade de cisalhamento e (b) tensão de cisalhamento, ambas em função da taxa de cisalhamento (curvas sobrepostas) para a solução de AH produzido pela cepa ATCC 39920 e para o padrão.	55
Figura 5.5: Espectro viscoelástico com as medidas em escala logarítmica de G' , G'' e η^* em função da velocidade angular para a solução de AH (a) padrão e (b) produzido por fermentação com a cepa ATCC 39920.....	58
Figura 5.6: Viscosidade específica reduzida e inerente versus a concentração de AH (a) padrão e (b) produzido pela cepa ATCC 39920 em solução de NaCl.....	60
Figura 5.7: Espectro de infravermelho do (a) AH padrão, (b) Hialuronato de sódio padrão e (c) AH produzido - transmitância versus número de onda (cm^{-1}).	63
Figura 5.8: Superfície de resposta para a massa celular seca.....	66
Figura 5.9: Superfície de resposta para concentração do NaAH produzido.	68
Figura 5.10: Superfície de resposta para viscosidade limite do AH produzido.	69
Figura 5.11: Curvas reológicas do AH produzido por via microbiana, com e sem adição de lisozima em comparação com o padrão. (a) curva de escoamento e (b) curva de viscosidade.	71
Figura 5.12: Módulo G' (componente elástica), módulo G'' (componente viscosa) e viscosidade complexa η^* do ácido hialurônico em função da frequência, (a) fermentação com lisozima (b) sem lisozima e (c) padrão.	72
Figura 5.13: Perfis cinéticos do pH, OD e concentrações de massa celular, substrato e produto com aeração contínua de 2,0 vvm (sem corte de oxigênio).	74
Figura 5.14: Curvas de viscosidade do AH produzido com aeração 2,0 vvm (Bioflo III), aeração natural (frascos de Erlenmeyer) e o AH padrão.	75

Figura 5.15: Caracterização reológica e viscoelástica do ácido hialurônico produzido por via microbiana com aeração de 2,0 vvm, (a) e (b) para 8 h, (c) e (d) para 16 h e (e) e (f) para 24 h de cultivo.	77
Figura 5.16: Comparação do módulo elástico G' para os tempos de 8, 16 e 24 h, para a solução de AH obtida por via microbiana com aeração de 2,0 vvm.	78
Figura 5.17: Comparação do módulo elástico G' para as soluções de AH obtidas com adição de lisozima e com aeração de 2,0 vvm.	79
Figura 5.18: Perfis cinéticos do oxigênio dissolvido (OD), pH, biomassa e AH para as diferentes combinações.	80
Figura 5.19: Variação do oxigênio dissolvido em função do tempo (a) 2 h, (b) 6 h obtida pelo método dinâmico e (c) 12 h pelo método do balanço de oxigênio.	83
Figura 5.20: Perfil do $k_L a$ ao longo do tempo de cultivo para a cepa ATCC 39920.	84
Figura 5.21: Perfis cinéticos do oxigênio dissolvido (OD), pH, concentração de biomassa e glicose em fermentação com a cepa ATCC 39920.	85
Figura 5.22: Perfis cinéticos do pH, oxigênio dissolvido e concentrações de massa celular, substrato e produto (a) sem corte de oxigênio, (b) com corte em 8 h e (c) com corte em 16h.	88
Figura 5.23: Microscopia Eletrônica de Varredura, do microrganismo <i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920 nos tempos de fermentação (a) e (b) 2 h, (c) e (d) 10 h e (e) e (f) 24 h. Amplificações (a)23000 X, (d) 7750 X, (c) e (f) 10000 X e (b) e (e) 20000 X.	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1: Meio para crescimento dos microrganismos produtores de AH.....	37
Tabela 4.2: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2 ²	39
Tabela 4.3: Matriz do planejamento fatorial 2 ²	39
Tabela 4.4: Equações para a construção do gráfico da viscosidade intrínseca.....	44
Tabela 5.1: Produtividade específica e volumétrica, velocidade específica máxima de crescimento celular e fatores de conversão para as três cepas de <i>Streptococcus</i> em 24 h de cultivo.....	51
Tabela 5.2: Viscosidades específica reduzida e inerente para soluções de AH padrão e produzido por fermentação da cepa ATCC 39920.	59
Tabela 5.3: Viscosidades das amostras de AH autoclavadas e não autoclavadas	64
Tabela 5.4: Efeitos estimados para a resposta massa celular seca.....	66
Tabela 5.5: Efeitos estimados para a resposta concentração de NaAH.....	67
Tabela 5.6: Efeitos estimados para a resposta viscosidade	68
Tabela 5.7: Efeito da adição de lisozima na produção e nas propriedades do ácido hialurônico produzido por <i>S. zooepidemicus</i>	70
Tabela 5.8: Comparação dos parâmetros cinéticos da produção de AH com aeração forçada de 2,0 vvm e natural.	73
Tabela 5.9: Efeito da aeração forçada na produção e nas propriedades do ácido hialurônico produzido por <i>S. zooepidemicus</i>	76
Tabela 5.10: Valores de concentração, viscosidade, viscoelasticidade e massa molar para as diferentes combinações de agitação e taxa de aeração.	81
Tabela 5.11: Valores de k _L a nos tempos de 0, 6, 12 e 24 h de fermentação.	84
Tabela 5.12: Concentração, viscosidade, viscoelasticidade e massa molar para os processos com e sem corte de oxigênio em 24 h de cultivo.....	86

NOMENCLATURA

AH - Ácido Hialurônico

ATCC - American Type Culture Collection

ATP – Adenosina Trifosfato

Da – Daltons

dv_x - Gradiente de Velocidade.

DO - Densidade Ótica

G' - Módulo de Rigidez (componente elástica)

G'' - Módulo de Dissipação (componente viscosa)

GlcNAc - N-acetil-glicosamina

GlcUA - Ácido D-glicurônico

k - Índice de Consistência

$k_L a$ - Coeficiente de Película na Fase Líquida

M_v - Massa Molar do Polímero

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MQD - Meio Quimicamente Definido

NaAH - Hialuronato de Sódio

η - viscosidade intrínseca

τ - Tensão de Cisalhamento

$\dot{\gamma}$ ou D -.Taxa de Deformação

n - Índice de Escoamento

η^* - Viscosidade Complexa,

η' - Viscosidade de Dissipação

η'' - Viscosidade de Rigidez

η_∞ - Viscosidade Limite

OD - Oxigênio Dissolvido

PSE - Polissacarídeo Extracelular

PHBs - Polialcanoatos

σ_0 - Amplitude Máxima de Tensão

γ_0 - Amplitude Máxima de Deformação

δ = Ângulo de Mudança de Fase

1.0. INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molar composto de unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4 (Lehninger, 1988). O polímero é encontrado naturalmente nos tecidos conjuntivos de mamíferos e pode ser extraído do fluido sinovial, pele, tendões e particularmente do corpo vítreo dos olhos, do cordão umbilical e também da crista de galo (Kim *et al.*, 1996). Em culturas bacterianas de *Streptococcus* do grupo A e C de Lancefield, o biopolímero é apresentado na forma de cápsula extracelular (Chong *et al.*, 2005).

O AH possui importantes aplicações nas áreas médico-farmacêutica e cosmética (Holmstrom & Ricici, 1967). É usado no tratamento de doenças degenerativas e inflamatórias das articulações dos ossos (Kim *et al.*, 1996), na reposição do fluido sinovial, na liberação de agentes quimioterápicos em implantes cirúrgicos (Jernberg, 1994, Aebischer *et al.*, 2001), como meio hidratante e como sistema para encapsulação e liberação controlada de fármacos e cosméticos.

As principais fontes comerciais do AH são o cordão umbilical e a de crista de galo. O produto extraído dessas fontes necessita de purificação laboriosa para a sua utilização nas aplicações citadas. Essas dificuldades motivaram o estudo da produção do AH por cultivo de microrganismos, uma vez que é componente capsular de bactérias tais como *Streptococcus*. O polímero bacteriano produzido é idêntico ao AH eucariótico (Holmstrom & Ricici, 1967; Rijn & Kessler, 1980; Johns *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1996, Armstrong *et al.*, 1997 e Chong & Blank, 1998).

A literatura relata que o processo bacteriano para a produção do AH permite a otimização do rendimento e da qualidade do produto através da engenharia genética e do controle das condições de cultura. A fermentação em batelada é a mais estudada para a produção do biopolímero. A massa molar do AH tem sido considerada a propriedade mais importante nas aplicações médicas que envolvem principalmente implantes ósseos, para as quais não só são requeridos os efeitos de amortecimento devidos à viscosidade, mas também os efeitos elásticos desempenhados pela sua viscoelasticidade. Nem sempre o AH viscoso é também viscoelástico. Ressalta-se que o AH de alta massa molar, da ordem de 10^6 Da, possui alto valor agregado, R\$ 150,00/100mL (maio/2001), e não é produzido comercialmente no Brasil.

Os trabalhos científicos encontrados na literatura sobre o assunto, concentram-se principalmente na busca do aumento do rendimento e massa molar do AH produzido. A composição de meios de cultura, espécies das cepas de *Streptococcus*, aeração do meio, concentração de glicose, pH, temperatura e agitação foram os fatores mais estudados.

Embora seja conhecida a rota metabólica de produção do AH, os mecanismos que conduzem à sua formação, polimerização e extrusão através da membrana celular ainda não foram elucidados. Trabalhos mais recentes relatam estudos sobre modificações genéticas e influência do nível de ATP na célula sobre a produção e massa molar do AH (Chong & Blank, 1998). Apesar de citada na revisão bibliográfica de algumas patentes, a viscoelasticidade do AH ainda não é estudada em profundidade, nem correlacionada com as variáveis operacionais da sua produção.

No presente trabalho, a produção do AH por fermentação foi estudada em quatro grandes etapas: seleção da cepa dentre três linhagens fornecidas pela ATCC; otimização da razão entre as fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura; influência da adição de

lisozima; aeração, agitação e cálculo da transferência de oxigênio. Em todos os casos o AH produzido foi caracterizado quanto à concentração, viscosidade, viscoelasticidade e massa molar. As fermentações foram realizadas em batelada e as propriedades do AH correlacionadas com as variáveis operacionais do processo.

Os resultados demonstram a produção por fermentação do AH de alta massa molar, viscosidade e viscoelasticidade, utilizando cepas de *Streptococcus*. A influência das variáveis operacionais: razão entre as fontes de carbono e nitrogênio, agitação e aeração foram caracterizadas e correlacionadas com as propriedades físico-químicas do produto. O conjunto de dados experimentais obtidos e a sua interpretação fornecem informações úteis que contribuem para o entendimento do comportamento da fermentação, produção e polimerização do AH.

Os capítulos subseqüentes descrevem com detalhes a revisão bibliográfica sobre o assunto, o material e as metodologias utilizadas, os resultados, as conclusões e as sugestões para trabalhos futuros.

2.0. OBJETIVO

Este projeto tem como objetivo estudar a produção do ácido hialurônico (AH) por cepas de *Streptococcus*, correlacionando as variáveis do processo com a sua massa molar, viscosidade e viscoelasticidade.

Para atingir esse objetivo, foram abordados os seguintes aspectos:

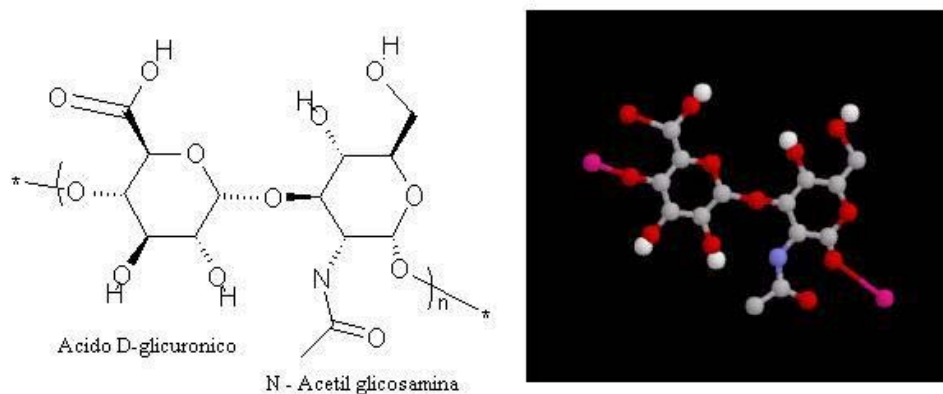
1. Avaliação de três cepas de *Streptococcus* quanto à capacidade de produção de AH de alta massa molar, com propriedades viscosas e viscoelásticas.
2. Separação do AH do meio de fermentação através de precipitação.
3. Caracterização das propriedades do AH produzido: massa molar, viscosidade e viscoelasticidade.
4. Avaliação dos efeitos da esterilização por calor úmido sobre as propriedades do AH.
5. Estudo da influência das fontes de carbono e nitrogênio adicionadas ao meio na produção e propriedades do AH.
6. Avaliação da influência da adição de lisozima ao meio, como favorecedora da produção de AH.
7. Avaliação da influência do oxigênio dissolvido na produção do AH – Efeitos da aeração e agitação.
8. Efeitos do corte da aeração nas fases exponencial e estacionária do crescimento celular.
9. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, k_{La} , ao longo da fermentação.

3.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica descreverá os principais estudos referentes à produção do ácido hialurônico (AH) por via microbiana que datam desde 1937, com o trabalho de Kendall *et al.* que o isolou de culturas de *Streptococcus hemolíticos* do grupo A para aplicações em estudos sorológicos obtendo 100 mg de AH/L meio de cultura. Apresentará também com detalhes os métodos utilizados na caracterização da massa molar, viscosidade e viscoelasticidade de AH.

3.1. Ácido Hialurônico: Estrutura e Funções

O ácido hialurônico (AH) é um membro da família dos glicosaminoglicanos, também chamada de mucopolissacarídeo e está presente na substância fundamental ou cimento intercelular dos tecidos animais e nas cápsulas de certas bactérias. O AH é linear, não ramificado e consiste de unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil-glicosamina (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4, Figura 3.1 (Chong & Blank, 1998). O número de unidades dissacarídicas repetitivas na molécula de ácido hialurônico extraída de tecidos animais pode exceder a 30.000.000, ou seja, uma massa molar maior do que 10^7 Da (Weigel *et al.*, 1997).



(a)



(b)

Figura 3.1: (a) Fórmula espacial e molecular da unidade repetitiva dissacarídica, do Ácido Hialurônico, formada por ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil glicosamina (GlcNAc). (b) Polímero linear formado com N-unidades repetitivas dissacarídicas.

Quando o AH, um polissacarídeo polianiónico, é incorporado a uma solução aquosa neutra ocorrem ligações por pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos carboxila e N-acetil, conferindo ao polímero capacidade de retenção de água e dureza conformacional, que limita a sua flexibilidade (Chong & Blank, 1998). Gómez-Alejandre *et al.* (2000) citam também que os centros hidrofóbicos da cadeia do AH são responsáveis

pelas interações inter e intramoleculares que fornecem rigidez a molécula. O AH pode adotar diferentes conformações dependentes do nível de hidratação, do ambiente iônico e da temperatura.

A solução de ácido hialurônico tem consistência gelatinosa, alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação devido às características estruturais da molécula. Este ácido está presente em vários tecidos conectivos de animais, preenchendo os espaços intercelulares, tais como a pele e a cartilagem com a importante função da flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos. Alguns órgãos possuem altas concentrações de ácido hialurônico, tais como o cordão umbilical, fluido sinovial e o humor vítreo. Na pele e em cartilagens, a sua função é ligar-se à água e reter a tonicidade e elasticidade dos tecidos. Nos fluidos das articulações, serve como lubrificante proporcionando um meio protetor para as células (Kim *et al.* 1996).

Habasseda (1997) relata que o ácido é um componente extracelular do tecido conectivo que controla o estado de hidratação e o tráfico de macromoléculas na matriz dos tecidos e atua especialmente na regeneração pós-inflamatória, com atividade específica na migração dos fibroblastos e da fibrogenese. Pode ser utilizado no tratamento de diversas doenças inflamatórias das articulações dos ossos e das articulações temporomandibular com bons resultados. O AH endógeno encontra-se presente em concentrações elevadas no tecido gengival, onde participa da reparação após intervenção odontológica e do restabelecimento da estrutura do tecido após uma gengivite.

3.2. Aplicações do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (AH) não é imunogênico e, portanto possui um grande potencial de aplicações médicas e cosméticas nas áreas de oftalmologia, ortopedia,

implante de próteses, cicatrização de feridas, terapia de artrite, prevenção de adesão de tecidos em cirurgias, oncologia e dermatologia (Holmström & Ricici.,1967).

Soluções ultra puras de AH extraídas de crista de galo foram usadas por vários anos como meio suporte em cirurgias oftálmicas, e preparações similares têm sido utilizadas em doenças degenerativas e inflamatórias das articulações dos ossos de animais e humanos (Kim *et al.*,1996). O AH é responsável pela propriedade viscoelástica do fluido sinovial (fluido sinovial saudável contém 7,0 mg/mL de AH). Injeções locais intra-articulares de várias formas de AH têm emergido como uma alternativa efetiva e tolerante à administração de drogas não esteroidais e às injeções de corticóide, pois atuam como lubrificante e amortecedor, protegendo as superfícies das cartilagens, melhorando a mobilidade e a dor. (Brandt *et al.*, 1999 e Altman & Roland., 1999). Haney & Doty. (1998) demonstraram que barreiras compostas por derivados de ácido hialurônico ligados quimicamente reduzem a formação de adesão no período pós-operatório sem nenhum impacto adverso no fluido peritoneal e peritônio.

Com relação à farmacocinética do AH, Habasseda (1997) relata que em administrações sistêmicas o AH se distribui rapidamente, com uma vida plasmática de aproximadamente de 10 minutos e é metabolizado no fígado, no entanto após a administração tópica as concentrações plasmáticas são muito baixas, o que mostra uma escassa absorção percutânea e uma permanência máxima do fármaco no sítio de ação terapêutica desejada.

Estudos mais recentes de aplicações utilizam o AH não somente como fluido lubrificante, mas também como sistema de liberação controlada de fármacos, tais como no prolongamento da anestesia em articulações dos ossos e cavidades (Goldenheim *et al.*, 2001), tratamento de artropatia (Suzuki *et al.*, 2001), liberação de agentes quimioterápicos em implantes cirúrgicos (Jernberg, 1994, Aebischer *et al.*, 2001), implantes de fármacos em

cáries dentárias (Suhonen & Schug, 2000), sistema de liberação controlada de antígenos para imunoterapia (Pardoll *et al.*, 2001).

3.3. Fontes do Ácido Hialurônico

O AH foi isolado a primeira vez, em 1937, do humor vítreo dos bovinos por Lowry & Beavers (Gómez-Alejandre, *et al* 2000). Encontrado naturalmente nos tecidos conjuntivos de mamíferos, o ácido hialurônico pode ser extraído do fluido sinovial, pele, tendões e particularmente do corpo vítreo dos olhos, do cordão umbilical e também da crista de galo. O ácido hialurônico disponível comercialmente é suprido prioritariamente pelas duas últimas fontes. No entanto, a obtenção do ácido puro a partir dessas fontes naturais apresenta duas grandes desvantagens: necessidade de purificação laboriosa, uma vez que esse produto encontra-se usualmente misturado com outros mucopolissacarídeos e proteínas, e redução da sua massa molar, devido à degradação das suas cadeias nos procedimentos complexos requeridos para a purificação.

Chong & Blank (1998), citam também que o processo de extração do AH de tecidos animais (humor vítreo e cordão umbilical) possui algumas desvantagens com relação à obtenção por via microbiana, que são: redução da massa molar após os processos de extração e purificação do AH; dificuldades de isolar moléculas de alta massa molar, pois estas formam um complexo com os proteoglicanos; controle impraticável da massa molar do biopolímero quando este é sintetizado nos tecidos animais, além do ponto de vista social que baseado em argumentos morais e éticos resiste à utilização de bioquímicas derivadas de animais, devido ao risco de infecções virais.

Baseando-se no crescente estudo da produção do AH por via microbiana a partir de bactérias e nas várias desvantagens do processo tradicional, o segmento industrial tem

investido n de fermentação bacteriana com a finalidade de obter um biopolímero viável comercialmente, pois neste processo o AH, que é um polissacarídeo extracelular (PSE), é excretado no meio de cultivo possibilitando o controle das características do polímero e do rendimento do produto. A quantidade de biopolímero que pode ser produzido por esta rota é teoricamente ilimitada (Chong & Blank, 1998).

O polímero bacteriano produzido é idêntico ao AH eucariótico, o que torna a via microbiana uma rota alternativa viável para obtenção desse produto conforme descrito nos trabalhos de Holmström & Ricici (1967), Rijn & Kessler (1980), Johns *et al.* (1994), Kim *et al.* (1996), Armstrong *et al.* (1997).

O uso de bactérias para a produção do AH tem sido defendido por várias razões técnicas, econômicas e éticas. A produção por *Streptococcus* é conhecida por mais de 50 anos, e a maioria dos sistemas divulgados na literatura referem-se ao uso de *Streptococcus* do grupo de Lancefield, onde o grupo A é considerado como patógeno humano (Kendall *et al.*, 1937) e o grupo C (*Streptococcus equi*, *equisimilis* e *zooepidemicus*), patógeno de animais. A síntese de AH como principal polissacarídeo capsular nesses patógenos é um fator biocompatível que permite a estas bactérias gram-positivas evadir as defesas do organismo e conseqüentemente causar alto nível de virulência (Roberts *et al.*, 1989). A produção do ácido por via microbiana, a partir de bactérias gram-positivas tais como *Streptococcus*, produz uma cápsula mucóide de polissacarídeos (produto extracelular), como pode ser visto na Figura 3.2 (Chong & Blank, 1998).

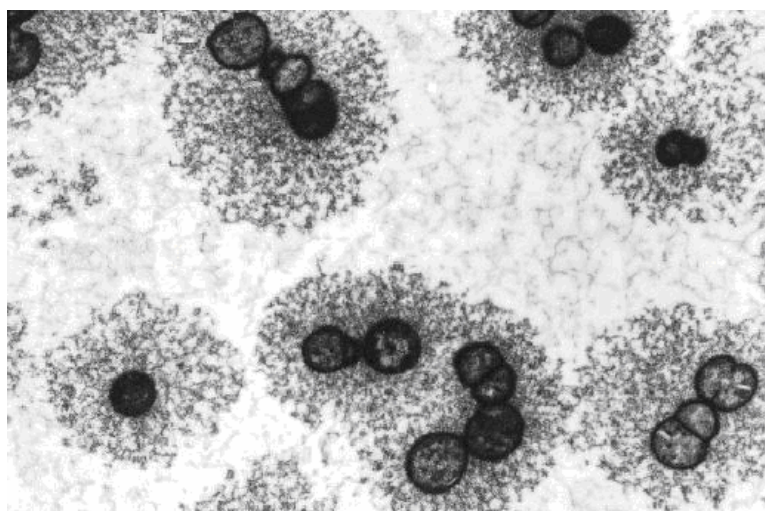


Figura 3.2: Células de *Streptococcus zooepidemicus* (bactéria gram-positiva) com suas cápsulas de ácido hialurônico em meio aerado.

As fermentações utilizando *Streptococcus* selvagem são capazes de fornecer somente AH com massa molar média na faixa de 1 a 4 MDa enquanto que as cadeias obtidas de tecidos animais alcançam 10 MDa (Chong & Blank 1998).

Estudos do processo bacteriano têm focado a otimização da qualidade e do rendimento de AH, de diferentes massas molares, através da engenharia genética e do controle das condições de cultura (Armstrong *et al.*, 1997).

3.4. Requerimentos do Ácido Hialurônico para Aplicações Médicas

O ácido hialurônico (AH) para aplicações médicas deve em todos os casos ter um elevado grau pureza e apresentar-se em faixa de massa molar mais adequada para a aplicação específica. O AH encontrado no fluido sinovial tem massa molar de 1-8 MDa, o de cordão umbilical é em torno de 3,6-4,5 MDa e o AH de crista de galo deve atingir valores maiores, tais como acima de 12-14 MDa. No entanto, os requerimentos de pureza e esterilização para as aplicações reduzem muito a massa molar do produto. A composição do

AH é a mesma, independente da fonte. A combinação das suas propriedades elásticas e viscosas está correlacionada com a sua massa molar.

Nas aplicações como lubrificante e amortecedor, melhorando a mobilidade e a dor, produtos comerciais tais como o *Orthovisc* (Anika Therapeutics Inc., EUA) e *Hyalgan* (Fidia Pharmaceutical, Itália) designados como de alta massa molar, embora não especificada, produziram excelentes resultados nos estudos da terapia da Osteoartrite (Brandt *et al.*, 1999 e Altman & Roland, 1999). Massas molares menores, na faixa dos produtos comerciais de 3-5 MDa são adequadas para redução de adesões em períodos pós-operatórios e implantes. Menores faixas de massa molar são adequadas para a utilização do AH como suporte para a encapsulação e liberação controlada de fármacos (Jernberg, 1994, Aebischer *et al.* 2001, e Pardoll *et al.*, 2001), como barreira tópica de proteção para a pele (Noll & Noll, 1998), e em aplicações cosméticas. Do exposto conclui-se que o AH apresenta importantes aplicações em toda a sua faixa de massas molares.

Os AHs comerciais de maiores massas molares atualmente encontrados no mercado têm como fonte a crista de galo, e são designados como: *Healon.RTM.* e *Healon .RTM.GV*, ambos produzidos pela Pharmacia AB (Suécia), os quais possuem massas molares em torno de 3,5 e 5 MDa respectivamente. Esses valores se referem aos produtos esterilizados, o que significa que anteriormente a esse processo as massas molares eram da ordem de 5 a 7 MDa. Os AHs com massa molares mais elevadas obtidos de sistemas bacterianos situam-se na faixa de 4 MDa antes do processo de esterilização e estão registrados nas várias patentes da *Fermentech* (1-3 MDa), *Chisso Corp.* (2-3 MDa), *Denki Kagaku Kogyo KK* (2-4 MDa) e *Mobay Chemical Corp.* (2-4 MDa). Processos para a produção de AH de massa molares maiores, além de 6 MDa, são recentes, e utilizam cepas supercapsuladas de *S. equi* obtidas por mutagênes (St.ang.hl, 2000).

3.5. Biossíntese do Ácido Hialurônico

Estudos da biossíntese do AH por *Streptococcus* do grupo A abordaram inicialmente a determinação dos precursores das porções constituintes da molécula do ácido hialurônico, e mostraram que as porções ácido D-glicurônico e N-acetil-glicosamina são derivadas da glicose sem cisão prévia da sua molécula (Roseman *et al.*, 1953).

Citado por Weigel *et. al.* (1997), Markovitz *et al.* (1959 e 1962) examinaram o mecanismo de crescimento da cadeia de AH em uma preparação enzimática livre de células, obtida de *Streptococcus pyogenese* do grupo A. Dados experimentais mostraram que a elongação da cadeia de AH ocorre pela transferência de unidades de monossacarídeo dos derivados de uridina nucleosídeo difosfato para as extremidades não redutoras do oligossacarídeo endógeno. Nenhuma transferência foi observada quando um oligossacarídeo exógeno pré-formado foi tratado com a preparação enzimática. Assim, monossacarídeos provenientes da N-acetil-glicosamina difosfato e N-acetil-glicosamina-1-fosfato seriam incorporados à molécula formando a porção acetil-glicosamina do ácido AH, enquanto que os monossacarídeos provenientes da uridina difosfogluconato seriam incorporados na porção glicuronato do ácido. Foi então proposto um mecanismo de síntese, que envolve a incorporação de um a um dos grupos alternados dos monossacarídeos ao dissacarídeo uridina difosfato iniciador, envolvendo somente uma enzima, ao invés da polimerização dos dissacarídeos iniciadores formados. Uridina difosfato foi o único nucleotídeo de uridina detectado como produto. A síntese era dependente da configuração da superfície da enzima hialuronato sintase, estabilizada pela presença de íons magnésio e pela porção uridina nucleosídeo difosfato. O mecanismo da terminação da elongação da cadeia do ácido não é conhecido, porém apontam-se como controladores os substratos e produto. Características adicionais da enzima responsável pela síntese foram determinadas

por Stoolmiller & Dorfman (1969) tais como o pH ótimo 7,1 para a formação do polissacarídeo, a concentração ótima de Mg^{++} (10 mM) ou Mn^{++} (1mM) para a máxima atividade da enzima, e as constantes de Michaelis para a uridina difosfogliconato (5×10^{-5} M) e para a uridina difosfo-N-acetil-glicosamina (5×10^{-4} M). A presença de ácido acético no meio indica o favorecimento da utilização da fonte de energia para a produção de biomassa, enquanto que a predominância de ácido lático é indicativa do favorecimento da produção de AH (Swann *et al.*, 1990).

Chong & Blank (1998), analisaram o ciclo metabólico para produção de ácido hialurônico e apresentaram um esquema para síntese do AH onde mostram que existe uma relação inversa entre a taxa de crescimento específico da bactéria e a massa molar do AH produzido. Este efeito tem sido explicado pelo modelo metabólico baseado nas fontes de carbono, nitrogênio e energia mostrados na Figura 3.3 (Chong & Blank, 1998).

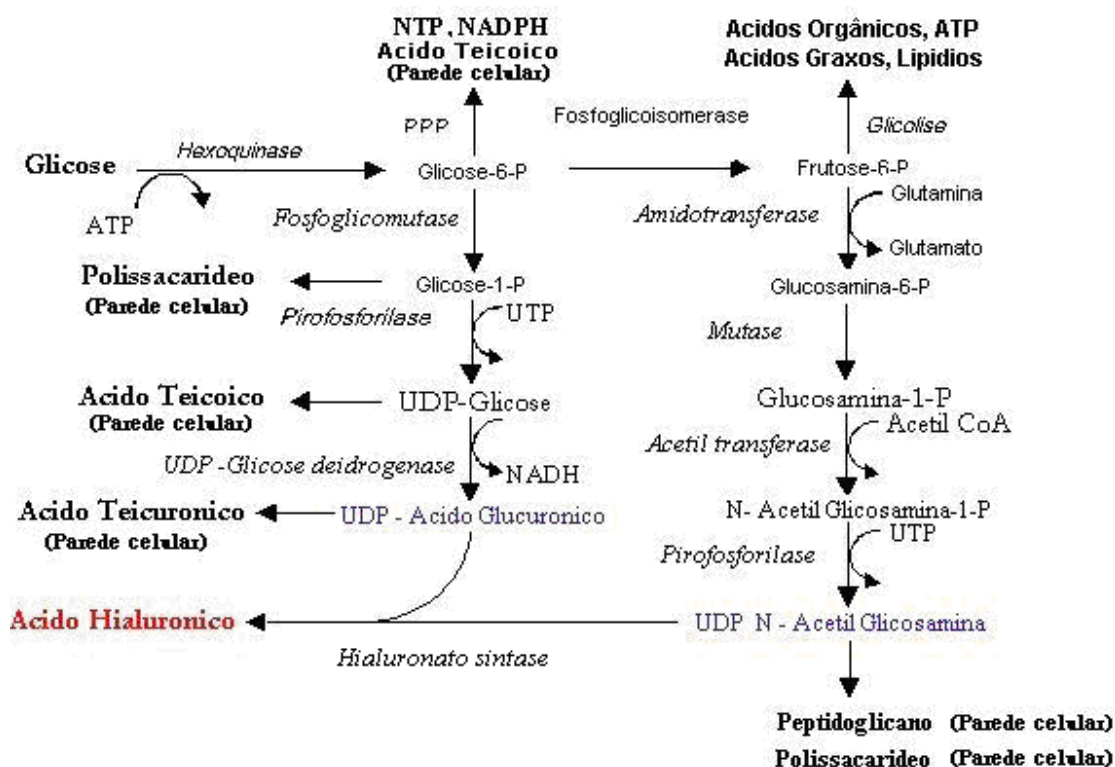


Figura 3.3: Esquema da Biossíntese do Ácido Hialurônico.

Nesta forma simplificada podem-se identificar dois processos competindo com a célula bacteriana: o crescimento celular e a biossíntese do AH. Estes dois processos competem por fontes limitadas principalmente carbono, nitrogênio e energia. Para baixas taxas de crescimento específico a célula direciona mais precursores ativados derivados da glicose (UDP-glicurônico e UDP-N-acetil-glicosamina) para a síntese do AH do que para a síntese da parede celular, Figura 3.4. Grandes quantidades de ATP obtidas do catabolismo da glicose aeróbia favorecem a formação de UTP, o qual é requerido para a formação dos dois precursores ativados da síntese do AH. A glicose a qual deveria ser usada para a síntese do AH, é também consumida para a produção de lactato no crescimento anaeróbio (Chong & Blank, 1998).

Estudos recentes de Chong & Nielsen (2003-b), afirmam que os *Streptococcus* do grupo A e C de Lancefield são as cepas preferenciais para a obtenção do AH, o qual é sintetizado na forma de cápsula extracelular, por via microbiana. O AH é gerado a partir da glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, através dos precursores ácido UDP-glicurônico e UDP-N-acetil-glicosamina, os quais são polimerizados pela enzima Hialuronato sintase. A síntese do AH exige muita energia do microrganismo, requerendo um total de 4 moles de ATP para cada 1 mol de unidade dissacarídeo do AH. A reação de oxidação catalisada pela dehidrogenase UDP-glicose gera 2 moles de NADH para cada 1 mol de AH sintetizado. A implicação deste modelo é que a quantidade de precursores deve estar balanceada para a produção de AH de elevada massa molar. A atividade da NADH oxidase é regulada pelo estado de energia da célula. Surpreendentemente, o estado de energia da célula tem pouco impacto no rendimento e massa molar do AH (Chong & Nielsen, 2003-b).

Chong & Nielsen (2003-a), relatam que a aeração aumenta grandemente a concentração de AH produzido por *Streptococcus zooepidemicus*. A NADH oxidase utiliza o oxigênio para reoxidar a NADH e conseqüentemente formar acetato, lactato e etanol. Sob

condições aeróbias, o consumo de glicose e a taxa de crescimento aumentam, produzindo acetato e quase nenhum etanol. Desta forma, o crescimento e a biossíntese do AH são dois processos fisiológicos que competem pelos mesmos precursores derivadas da glicose, portanto a redução da taxa de crescimento permite a maior produção de AH. O aumento do rendimento global de AH foi obtido através do controle de oxigênio disponível para o metabolismo do *S. zooepidemicus*. Em seu estudo Chong utilizou as condições de aeração de 0,4 vvm e agitação de 900 rpm, e em um determinado tempo na fase exponencial o oxigênio foi limitado para estimular uma grande produção de AH.

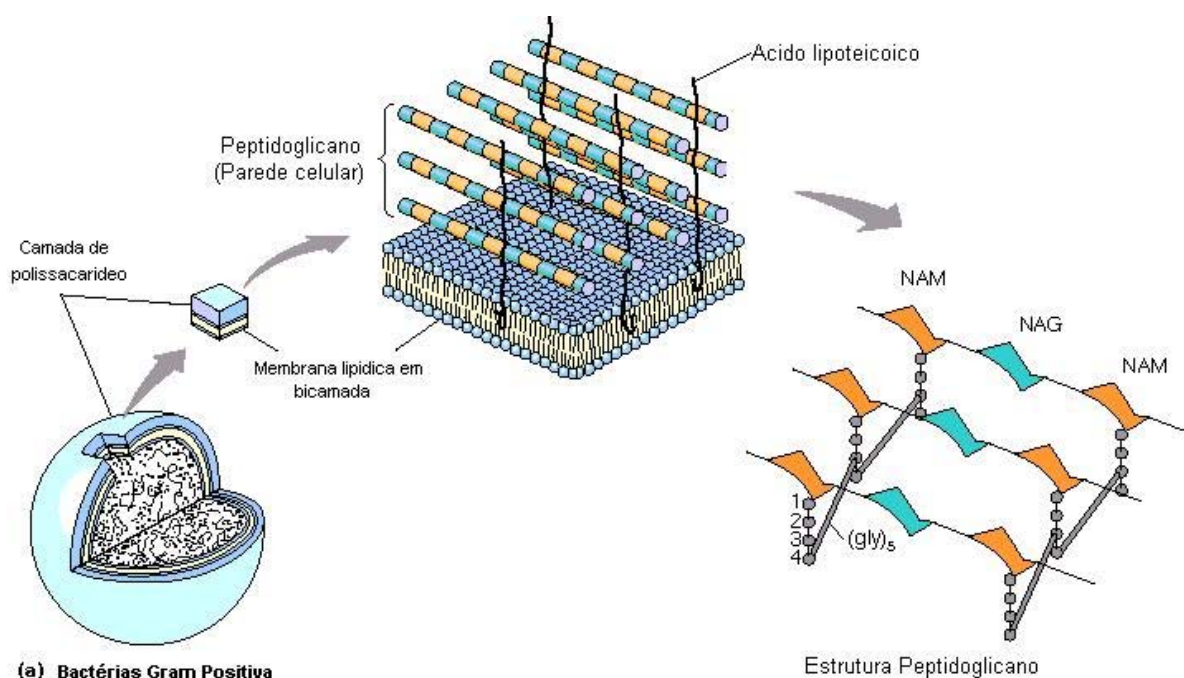


Figura 3.4: Parede celular formada por polissacarídeos e peptídeos (peptidoglicano) nas bactérias gram positivas (*Streptococcus*)

A parede celular de bactérias gram positivas é construída a partir de um dissacarídeo que contém um dos precursores da síntese do AH, o N-acetil-glicosamina que unido por

ligações β 1-4 ao N-acetil-murânico, formam a molécula glicano que varia no comprimento (de 5 a 30 unidades) dependendo do tipo de bactéria utilizada (Navarre & Schneewind, 1999). Como dito anteriormente a formação da parede celular bacteriana compete com a produção do AH pelo precursor N-acetil-glicosamina.

A taxa específica de produção do AH ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) aumenta com a diminuição da taxa de crescimento específica. Maiores taxas de produção podem ser atribuídas a maiores taxas de polimerização através da enzima responsável hialuronato sintase. Um aumento na atividade desta enzima pode conduzir a uma concentração elevada de substrato intracelular resultado de uma baixa taxa de crescimento. A massa molar do AH produzido é determinado pelo número de precursores que a sintase é capaz de polimerizar durante o seu tempo de meia vida, que é de 2 a 4 h. A similaridade entre os tempos levados para produzir uma cadeia de AH e o curto período de vida da sintase propõe que a enzima sintetiza somente uma cadeia durante este tempo (Chong & Blank, 1998).

Esta discussão conduz a um levantamento de várias estratégias para aumentar a massa molar do AH produzido, são elas: aumento do tempo de vida da sintase, diminuição da taxa de síntese da biomassa para reduzir a competição pelas fontes, aumento do fluxo de fontes para a síntese do AH e aumento da energia eficiente da célula (Chong & Blank, 1998).

Todo processo de síntese da cápsula de AH, citado anteriormente, ocorre dentro da célula bacteriana através da enzima hialuronato sintase que está associada à membrana da célula (Dougherty *et al.*, 1992). Esta enzima constrói um polissacarídeo com uma grande massa molar que é simultaneamente extrudado através da membrana até o espaço extracelular para formar a cápsula bacteriana. Este modo de biossíntese é único entre as macromoléculas visto que ácidos nucleicos, proteínas e lipídios são sintetizados no núcleo, retículo endoplasmático e Golgi, citoplasma ou mitocôndrias. A extrusão da cadeia formada

até o espaço extracelular permite o crescimento do polímero sem restrição, e em consequência disto a formação de um AH de alta massa molar. A ocorrência da síntese do confinada dentro de um complexo de Golgi limitaria a quantidade e o comprimento do polímero formado. Adicionalmente, altas concentrações de AH dentro de um lúmen confinado, podem criar um ambiente altamente viscoso e ser prejudicial a outras organelas (Weigel, 1997).

3.6. Estudos do Processo de Produção do Ácido Hialurônico

As pesquisas sobre o processo de produção do AH por via microbiana têm recebido considerável atenção nos últimos tempos, e nota-se que a partir da década de 80, os resultados das pesquisas encontram-se mais na forma de patentes que de artigos científicos. Os principais aspectos estudados são: as cepas de *Streptococcus*, os efeitos da aeração do meio, a presença de contaminantes indesejáveis como a estreptolisina que causa hemólise de células e a hialuronidase que degrada o ácido hialurônico, o rendimento do processo e a massa molar do AH produzido.

3.6.1. Cepas de *Streptococcus*

A produção por *Streptococcus* é conhecida por mais de 50 anos, e a maioria dos sistemas divulgados na literatura referem-se ao uso de *Streptococcus* do grupo de Lancefield, onde o grupo A é considerado como patógeno humano (Kendall *et al.*, 1937) e o grupo C (*Streptococcus equi*, *equisimilis* e *zooepidemicus*), patógeno de animais.

Os trabalhos iniciais reportados na literatura sobre a produção de ácido hialurônico por via microbiana, utilizaram cepas de bactérias do gênero *Streptococcus*, tais como *S. pyrogenes* (Grupo A), *S. equi*, *S. equisimilis*, *S. digalactiae* e *S. zooepidemicus* (Grupo C),

conhecidos como hemolíticos por exibirem beta-hemólise pela estreptolisina. Embora a correlação entre a capacidade de produção da estreptolisina e a patogenicidade do microrganismo não seja claramente entendida, o ácido hialurônico para aplicações médicas ou cosméticas não pode estar contaminado com essa proteína. É quase impossível, produzir efetivamente ácido hialurônico não contaminado com estreptolisina (Thonard *et al.*, 1963, Holmstron & Ricici, 1967 e Woolcock, 1974).

A partir da década de 80, mutantes das várias cepas foram isoladas com a finalidade de produzir AH livre de impurezas tóxicas como proteínas e ácidos nucleicos, bem como de hialuronidase, permitindo assim um melhor controle da massa molar do polissacarídeo. Assim, foram selecionados mutantes de *S. zooepidemicus*, HA-116, ATCC 39920 de patogenicidade desprezível (mínimo de hemolisina) (Nimrod *et al.*, 1988), NH-131, também não hemolítico, depositado no *Fermentation Research Institute* como FERM P-7580 e FERM BP-784 (Akasaka *et al.*, 1989), *S. equi* NCIMB 40327 (Ellwood, *et al.*, 1985), *S. zooepidemicus* NCTC 7023 (Swann *et al.*, 1990). *S. equi* KFCC 10830, mutante derivado do *S. equi* ATCC 6580 (Kim *et al.*, 1996), o qual teve características não hemolíticas e foi hialuronidase negativa, ou seja, não produtor de hialuronidase. Outra linhagem mutante de *S. equi*, ATCC 39506, também foi hialuronidase negativa (Brown *et al.*, 1988). Cepas de *Streptococcus* supercapsuladas obtidas por mutagênese de *S. equi* foram usadas por St.ang.hl. (2000).

As cepas de *Streptococcus* são nutricionalmente fastidiosas, anaeróbias facultativas e produzem ácido láctico como bioproduto do catabolismo da glicose. Conseqüentemente a energia recuperada por estas bactérias é relativamente menor do que nas bactérias aeróbias. O rendimento de HA nas fermentações bacterianas é relativamente baixo (0,1 g/g de glicose). Os requerimentos nutricionais complexos da bactéria influenciam na economia da

fermentação devido aos custos elevados do meio quimicamente definido utilizados para produção em grande escala (Chong & Blank, 1998).

3.6.2. Condições Operacionais, Produtividade e Massa Molar

Condições de fermentação aeróbias e anaeróbias são relatadas na literatura para a produção do AH por *Streptococcus*. Sob condições anaeróbias, o rendimento de AH varia na faixa de 0,3 a 1 g/L (Thonard *et al.*, 1964, Holmstrom & Ricici, 1967). O AH obtido nessas condições geralmente possui massa molar média 700.000 Da ou menor. Sob condições aeróbias, um produto com maior massa molar (cerca de 2.000.000 Da ou mais) pode ser obtido com rendimento equivalente (Akasaka *et al.*, 1983). O papel do oxigênio na produção de AH é controverso, e sugere-se que o AH funcione como uma proteção impermeável protegendo o *Streptococcus* dos efeitos tóxicos do oxigênio. Então, condições aeróbias estimulariam a produção de AH por um mecanismo protetor das células. Essa teoria foi em parte suportada no trabalho mais de Swann *et al.* (1990), que através de vários exemplos determinaram que rendimentos mais elevados de AH são obtidos com o crescimento controlado dos microrganismos. Reduzindo a disponibilidade de oxigênio em uma etapa crítica da fase exponencial de crescimento da biomassa, o microrganismo responde com maiores taxas de produção de AH. A escassez de oxigênio promove a produção de ácido láctico e AH, enquanto que maiores níveis de oxigênio estimulam a produção de biomassa e de ácido acético, em detrimento do AH.

Os efeitos do pH, agitação e aeração sobre a produção da AH por *S. zooepidemicus* foram estudados por Johns *et al.*, 1994. Essas variáveis tiveram grande influência na produção de AH em cultivo em batelada. O pH ótimo foi $6,7 \pm 0,2$, e taxas de agitação menores que 600 rpm conduziram ao declínio do rendimento e taxa de produção de AH. A

aeração melhorou o rendimento de AH produzido a partir de glicose. Acetato e ácido láctico foram produzidos nessas condições.

Kim *et al.* (1996) cresceram a cepa de *Streptococcus equi* ATCC 6580 em meio quimicamente definido, descrito por Stoolmiller & Dorfman (1969) para estudar mutantes negativos a hialuronidase. As várias condições de cultura foram otimizadas em fermentador de 5 L para produção de ácido hialurônico de alta massa molar. Os autores estudaram também o efeito da adição de lisozima, enzima bacteriolítica, ao meio de cultivo durante a fermentação, na produção e massa molar do AH produzido. A adição da lisozima foi realizada no meio de cultivo quando a densidade ótica a 600nm atingiu 1,0 e 3,0 o que resultou no aumento da produção de 3,65 g.L⁻¹ para 4,6 g.L⁻¹ e da massa molar do AH de 2,9 x 10⁶ Da para 3,8 x 10⁶ Da. A temperatura e o pH ótimos foram de 37°C e 7,0. Neste trabalho, foi também analisada a influência do tipo de impelidor em fermentador de bancada. Quando se utilizou o tipo *interming* a massa molar do AH aumentou para 4,8 x 10⁶ Da. A massa molar aumentou para 5,0 x 10⁶ Da quando a velocidade de agitação foi aumentada de 1000 para 1200 rpm. A maior massa molar de 4,8 x 10⁶ Da foi obtida com uma taxa de aeração de 1,0 vvm.

Chong & Blank, (1998) analisaram o efeito de vários parâmetros da fermentação na massa molar do AH produzido por *Streptococcus zooepidemicus* e determinaram que os fatores que tiveram maior efeito significativo na produção de AH de alta massa molar na cultura com *Streptococcus zooepidemicus* foram: a baixa temperatura (28°C), a aeração da cultura e a alta concentração de glicose (40 g/L) enquanto que o pH e a agitação não influenciaram o tamanho da massa molar.

A produção de AH em cultivo contínuo em reator do tipo CSTR foi patenteada por Ellwood *et al.*, (1995 e 1996), utilizando *S.equi* NCIMB 40327. O processo contínuo contorna os problemas da fermentação em batelada, na qual a degradação de enzimas pode

conduzir à quebra da parede da célula, liberando o conteúdo celular no meio de cultivo e dificultando a etapa posterior de purificação. Nesse processo, o AH produzido apresentou massa molar na faixa de 1,6 a 2,5 MDa, observando-se propriedades viscoelásticas na solução.

Cepas supercapsuladas de *Streptococcus* dos grupos A e C foram obtidas por mutagênese conforme descrito por Stangor (2000). Os exemplos mostram o processo conduzido em regime de batelada alimentada, em reator *air lift* e em cultivo contínuo. A massa molar do AH produzido foi maior que 6 MDa. Em todos os casos foi observada uma relação inversa entre o rendimento e a massa molar do AH.

3.6.3. Meios de Cultura

Do ponto de vista nutricional os *Streptococcus* estão entre as espécies mais complexas de bactérias com respeito às necessidades nutricionais (Swann *et al.*, 1990).

Streptococcus dos grupos A e C possuem numerosas exigências nutricionais com respeito ao nitrogênio orgânico. Meios típicos incluem extrato de levedura, peptonas ou caseína como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento, bem como sais de magnésio e fosfato. As fontes de nitrogênio orgânico são consideradas essenciais para um bom crescimento dos *Streptococcus*, sendo estes componentes provedores de uma grande proporção do carbono utilizado para a biossíntese celular (Armstrong & Johns, 1997).

Rijn & Kessler, (1980) formularam um meio quimicamente definido (MQD), suplementado com numerosas vitaminas e 20 aminoácidos (como fonte de nitrogênio orgânico), para o crescimento de cepas de *Streptococcus* do grupo A, onde concluíram que este meio possui muitas vantagens quando comparado a um meio complexo, que são: necessidade de pequeno volume de inóculo, curto período de adaptação e a duplicação da taxa de crescimento do *Streptococcus*.

Armstrong & Johns (1997), avaliaram os requerimentos nutricionais para o crescimento e a síntese do ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* (Grupo C). Um MQD foi desenvolvido para o cultivo do *Streptococcus zooepidemicus* em condições anaeróbias, o qual continha apenas 11 aminoácidos, essenciais ao crescimento, e a glutamina como a principal fonte de nitrogênio. Neste trabalho verificou-se que a taxa máxima de crescimento específico e produtividade volumétrica de AH (g/L.h) foi menor no MQD quando comparada ao meio complexo, entretanto a taxa de produção específica e a concentração final de AH (g/L) foram comparáveis nos dois meios. A massa molar média do AH produzido no MQD (2600 ± 100 KDa) foi maior do que no meio complexo (2200 ± 100 KDa). Apesar, desses resultados, a produção do AH no MQD foi considerada promissora.

3.6.4. Isolamento e Purificação do Ácido Hialurônico

O isolamento do ácido hialurônico (AH) do meio de fermentação tem sido feito por precipitação, utilizando vários agentes. Kendall *et al.* (1937) e Seastone (1939), isolaram o AH de *Streptococcus* hemolíticos do grupo A, usando acetato e etanol no sobrenadante das culturas, obtendo-se concentrações entre 60 - 140 mg/L. Warren & Gray, 1959, precipitaram o AH do mesmo tipo de meio de cultura utilizando acetona, acetato e etanol, e obtiveram concentração de 250 mg/L. Thonard *et al.*, 1963, isolaram e purificaram o AH com sulfato de amônia. No processo de purificação, o sulfato de amônia foi inicialmente adicionado ao caldo à concentração 50% para a remoção de proteínas, e após filtração e lavagem a concentração do sal foi aumentada para 65% para completa precipitação do AH. O método foi relativamente simples e reprodutível, com rendimentos muito altos de AH purificado, na faixa de 0,5 a 1,0 g/L do caldo original. Há também indicação de alto nível de pureza do AH obtido.

Brown *et al.* (1988), adicionaram à cultura no final da fermentação, o detergente não iônico lauril sulfato de sódio (LSS) para liberar o AH das células. A adição de um segundo detergente não iônico, o brometo de hexadeciltrimetilamônio precipitou o AH e o SLS inicialmente adicionado. O precipitado foi coletado por centrifugação, solubilizado em cloreto de cálcio e novamente centrifugado para remover os contaminantes celulares e os detergentes. O AH do sobrenadante foi precipitado com etanol e isopropanol várias vezes centrifugado e lavado para obtenção do produto puro. Para aplicações médicas, os ácidos nucleicos devem ser removidos da solução de AH, o que é feito por adição de um tensoativo catiônico (cloreto de cetilpiridina), e o precipitado com os ácidos nucleicos é removido por filtração (Ellwood *et al.*, 1995).

3.7. Caracterização do Ácido Hialurônico

3.7.1. Massa Molar

A massa molar do ácido hialurônico pode ser determinada por cromatografia de permeação em gel (Kim *et al.*, 1996) ou por estimativa indireta através da sua viscosidade intrínseca (Armstrong *et al.*, 1997)

A relação entre viscosidade intrínseca de uma solução polimérica com a massa molar viscosimétrica média é dada através da Equação 3.1 de Mark-Houwink (Armstrong *et al.*, 1997 e Armstrong & Johns, 1995).

$$\eta = k (M_v)^a \quad (3.1)$$

Onde: k e a são constantes que dependem do polímero, do solvente e da temperatura

η é a viscosidade intrínseca

M_v é a massa molar do polímero

Quando o valor da viscosidade intrínseca for maior do que 2960 mL/g multiplica-se este valor por um fator de 1,247 para corrigir o zero de cisalhamento.

3.7.2. Viscosidade e Viscoelasticidade

3.7.2.1. Viscosidade

A viscosidade é a propriedade mais importante que afeta o comportamento de escoamento de fluidos. Relaciona-se com a resistência do fluido ao movimento, e é um aspecto importante da reologia, a ciência da deformação e escoamento.

Os experimentos clássicos para determinação da viscosidade de fluidos foram feitos utilizando um material contido entre duas placas paralelas, sendo uma estacionária e a outra em movimento longitudinal ao sistema após a aplicação de uma força (F) paralelamente a placa, resultando no aparecimento de uma tensão de cisalhamento (τ) no sistema. O movimento da parte superior da placa em relação à parte estacionária resulta em um deslocamento relativo de todos os elementos presentes no sistema na direção “x” ao plano, ocorrendo então deformação. As propriedades mecânicas do material definem uma única relação entre tensão e deformação, com a distribuição homogênea de ambas. Para materiais homogêneos essas propriedades são independentes da posição. A variação da deformação na unidade de tempo é definida como taxa de deformação ($\dot{\gamma}$).

Com a aplicação de uma força (F), verifica-se o aparecimento de uma força de resistência (f), de mesma intensidade e com direção contrária ao movimento da placa adjacente à camada de líquido. Essa força, representada na Equação 3.2, é proporcional à área de contato (A) e ao perfil de velocidade na direção y .

$$f = \eta \cdot A \cdot \left(\frac{dv_x}{dy} \right) \quad (3.2)$$

Onde: η = viscosidade

dv_x = gradiente de velocidade.

A viscosidade de cisalhamento, ou simplesmente viscosidade, é uma propriedade do material independente da sua geometria.

Através da relação descrita acima se obtém a equação de Newton, Equação 3.3, válida para os fluidos designados como fluidos newtonianos, que relaciona tensão e taxa de cisalhamento no caso de escoamentos simples.

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (3.3)$$

Nessa relação, a tensão de cisalhamento é resultado de uma única força atuante no sistema, desaparecendo imediatamente quando essa força é interrompida. A viscosidade comporta-se como uma constante dependente do líquido, mas independente da geometria do sistema, da taxa de deformação e do tempo de cisalhamento.

Os líquidos que possuem algum desvio dessas condições ditas “ideais” são classificados como líquidos não-newtonianos. Os fluidos não-newtonianos são classificados como pseudoplásticos, caracterizados pela diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento e dilatantes quando a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento. Alguns fluidos pseudoplásticos apresentam uma resistência maior ao escoamento, com uma tensão mínima inicial designada como tensão mínima de escoamento (σ_0), a partir da qual têm o comportamento normal de um fluido pseudoplástico (Schramm, 1994).

3.7.2.2. Modelos matemáticos para fluídos puramente viscosos

É usual a descrição do comportamento dos fluídos não-Newtonianos através de modelos. Esse caminho obtém resultados mais satisfatórios quando comparados à aplicação de teorias que tentam descrever o comportamento dos fluídos através de sua estrutura molecular. Essa dificuldade está relacionada à extrema complexidade que a maioria dos materiais mais recentes possui.

O modelo de Ostwald-deWaele, é amplamente utilizado por possuir algumas características: consegue representar matematicamente muitas soluções poliméricas que são classificadas como não-newtonianas, é relativamente fácil para incorporar soluções analíticas a problemas de escoamento e possui poucas limitações, as quais se restringem a condições de altas taxas de cisalhamento.

O modelo de Ostwald-deWaele de dois parâmetros, também chamado de modelo da potência, relaciona a tensão de cisalhamento com a taxa de cisalhamento a partir de dois parâmetros representativos da solução em estudo, de acordo com a Equação 3.4.

$$\tau = k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (3.4)$$

O parâmetro (n), conhecido como índice de escoamento é um indicativo do quanto à solução estudada desvia-se do comportamento “ideal”, ou de um fluido Newtoniano ($n=1$). De acordo com o valor de (n), os fluidos classificam-se em:

→ $n > 1$ - dilatantes

→ $n < 1$ - pseudoplásticas

O parâmetro (k), conhecido como índice de consistência é um indicativo da estrutura interna presente na solução, permitindo avaliar como as partículas estão ligadas, e como estão dispostas no meio.

O comportamento reológico dos fluidos plásticos pode ser representado pelas Equações 3.5 e 3.6:

Fluido de Bingham $\tau = \tau_0 + K_p \dot{\gamma}$ (3.5)

Fluido de Casson $\tau^{\frac{1}{2}} = \tau_0^{\frac{1}{2}} + K_p \dot{\gamma}^{\frac{1}{2}}$ (3.6)

Onde τ_0 é a “*yield stress*”, tensão a partir da qual o escoamento é iniciado, e os fluidos de Bingham comportam-se como fluidos Newtonianos.

As curvas reológicas que descrevem o comportamento dos fluidos quanto ao escoamento, são apresentadas na Figura 3.5 (Schramm, 1994).

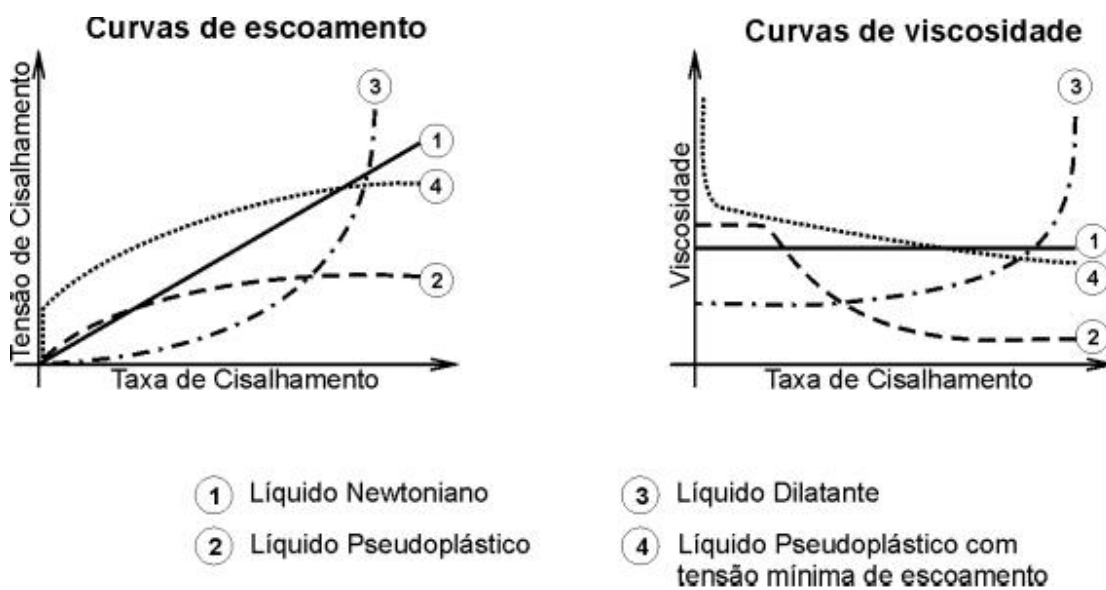


Figura 3.5: Classificação dos fluidos puramente viscosos.

3.7.2.3. Elasticidade

A elasticidade é uma propriedade importante no estudo dos sólidos. Um material com propriedades elásticas sofre deformação quando submetido a uma força qualquer. Essa deformação é perdida quando cessada a força, não existindo deformação permanente para um corpo elástico “ideal”.

A aplicação de uma força (f) paralelamente ao sistema, resulta em uma elongação (ΔL) e uma deformação (γ), como consequência da alteração do comprimento inicial do corpo, A elongação depende da intensidade da força (f) aplicada, e essa proporcionalidade é definida por uma constante, chamada constante elástica, propriedade do material e também da geometria do sistema,

A força, representada na Equação 3.7, é então proporcional à área da seção transversal e à deformação.

$$f = \frac{G \cdot A_0 \cdot \Delta L}{l_0} \quad (3.7)$$

Onde: G = constante elástica do material, A_0 = área inicial e l_0 = comprimento inicial.

Através da relação representada na Equação 3.7 obtém-se a equação de Hooke (Equação 3.8) que relaciona tensão de cisalhamento e deformação para sólidos “ideais”.

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (3.8)$$

A constante de proporcionalidade G , também chamada módulo elástico constitui uma propriedade do material.

3.7.2.4. Viscoelasticidade Linear

Os conceitos descritos até agora podem ser estendidos ao equacionamento do comportamento no qual um material possui simultaneamente propriedades viscosas e elásticas, ou seja, a caracterização do comportamento viscoelástico de materiais reais.

Quando se trabalha com viscoelasticidade linear trabalha-se também com analogias a modelos mecânicos. Utilizando essa abordagem, para materiais de comportamento puramente elástico a analogia feita é com o modelo da mola, envolvendo a Equação 3.8 de Hooke. Toda a energia investida é armazenada e devolvida pelo sistema. Quando se trabalha com materiais puramente viscosos a analogia feita é com o modelo do

amortecedor, envolvendo a Equação 3.3 de Newton. Toda energia investida é dissipada pelo sistema, na forma de calor.

Quando o sistema está sob condições dinâmicas, define-se ângulo de defasagem (δ), como sendo o ângulo entre as respostas obtidas da deformação e da tensão. O ângulo de defasagem é zero, quando aplicado ao sistema mola resulta em respostas em que a deformação e a tensão estão em fase, caracterizando os sistemas puramente elásticos. Para o sistema amortecedor as respostas obtidas da tensão em relação à deformação são defasadas em 90° , caracterizando sistemas puramente viscosos. No caso dos sistemas viscoelásticos, os ângulos de defasagem estão compreendidos entre os dois casos acima citados, ou seja, entre a ausência de defasagem e a defasagem de 90° .

A relação entre a amplitude máxima de tensão e a amplitude máxima de deformação define o módulo complexo $|G^*|$, que fornece informações sobre as propriedades viscoelásticas de qualquer substância através de suas duas componentes. A componente elástica (G'), chamada módulo de rigidez, é a medida da energia armazenada e devolvida pelo material. A componente viscosa (G''), chamada módulo de dissipação, é a medida da energia dissipada pelo material, normalmente na forma de calor.

Tanto os módulos de rigidez ou de dissipação podem ser calculados com a utilização das identidades trigonométricas descritas pelas Equações 3.9 e 3.10.

$$G' = |G^*| \cdot \cos \delta \quad (3.9)$$

$$G'' = |G^*| \cdot \sin \delta \quad (3.10)$$

As Equações trigonométricas 3.11 e 3.12 relacionam a viscosidade complexa η^* , outra propriedade viscoelástica, com suas componentes, definidas através da resposta elástica do material η'' e da resposta viscosa do material η' .

$$\eta' = \eta^* \cdot \sin \delta \quad (3.11)$$

$$\eta'' = \eta^* \cdot \cos \delta \quad (3.12)$$

Onde: η' = viscosidade de dissipação

η'' = viscosidade de rigidez

Uma relação importante, Equação 3.13, é chamada tangente de dissipação ($\tan \delta$), que também indica o quanto um material é mais caracteristicamente elástico ou viscoso.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (3.13)$$

Quando se trabalha com viscoelasticidade linear trabalha-se também com a estrutura molecular da cadeia polimérica e suas respectivas conformações. São vários os fatores que podem influenciar as propriedades viscoelásticas e suas respectivas funções. Alguns deles são: o comprimento, o número e o volume ocupado pelas cadeias poliméricas, as interações existentes entre as cadeias do mesmo biopolímero, ou entre outras cadeias poliméricas, e finalmente, interações das cadeias poliméricas com o solvente presente no sistema.

A Figura 3.6 mostra de forma genérica um espectro viscoelástico amplo, com as diversas possibilidades existentes de inter relacionamento entre propriedades viscoelásticas e as três estruturas coloidais relacionadas (Morris, 1990 e Steffe, 1996).

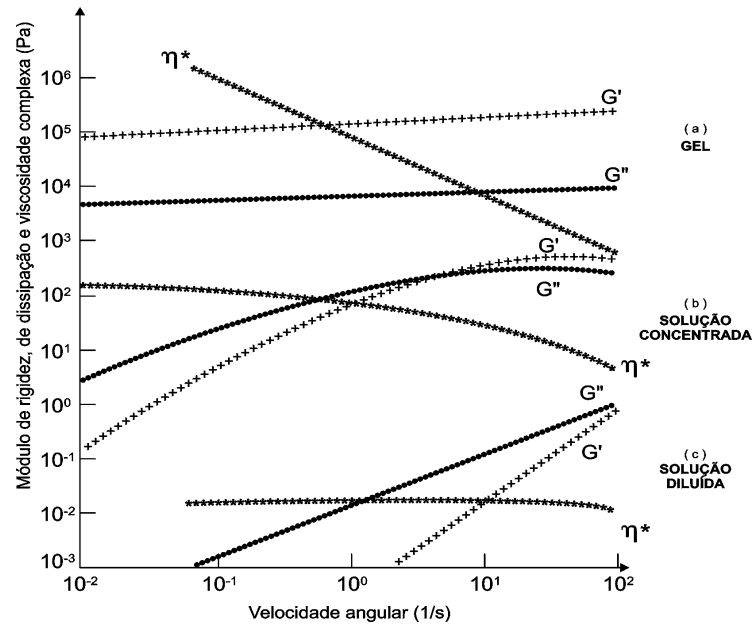


Figura 3.6: Espectro viscoelástico genérico envolvendo G'' (●●●), G' (++++) e η^* (***) de estruturas coloidais típicas, nas formas de: a) gel; b) solução concentrada; c) solução diluída, (Morris, 1990 e Steffe, 1996).

3.8. Caracterização da Fermentação Submersa

3.8.1. Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio (k_{La})

Durante o cultivo de microrganismos, a transferência de oxigênio ocorre da fase gasosa para a fase líquida, enquanto simultaneamente, o microrganismo consome o oxigênio dissolvido. Assim o equacionamento mais adequado é feito através de um balanço de oxigênio no meio líquido (Equação 3.14)

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) - Q_{O_2} \cdot X \quad (3.14)$$

Esta equação indica que a variação da concentração de oxigênio dissolvido no líquido (dC/dt) é o resultado da diferença entre a quantidade de O_2 que se consegue transferir ($k_L a (C_s - C)$) e o oxigênio consumido pela células ($Q_{O_2} X$).

O método mais utilizado para determinar o k_La e Q_{O_2} (velocidade específica de respiração) é a utilização de uma sonda para determinação da concentração de O_2 dissolvido, conhecido como método dinâmico (Humphrey & Taguchi, 1966).

Neste método, em um dado instante de um processo fermentativo (t_0), interrompe-se a aeração, de forma a anular a transferência de oxigênio, Figura 3.7. Recomenda-se também reduzir a frequência de agitação, a fim de reduzir ao máximo a transferência de oxigênio na superfície do líquido. Com o corte da aeração a concentração de O_2 dissolvido C_∞ , começa a diminuir, sendo que o sinal da sonda deve ser registrado continuamente, ao atingir um valor de C_0 (instante t), retoma-se a agitação e a aeração, nas condições que estavam sendo praticadas, observando-se, então, o aumento da concentração de O_2 dissolvido, até atingir novamente o valor de C_∞ . Este procedimento não é demorado, e depende propriamente da concentração celular existente. Neste curto intervalo de tempo, supõe-se que não haja alteração da concentração celular (X), assim como deve ser mantido constante o valor de Q_{O_2} , não permitindo que a concentração de O_2 atinja valores abaixo da crítica (deve-se manter $C > C_{crit.}$).

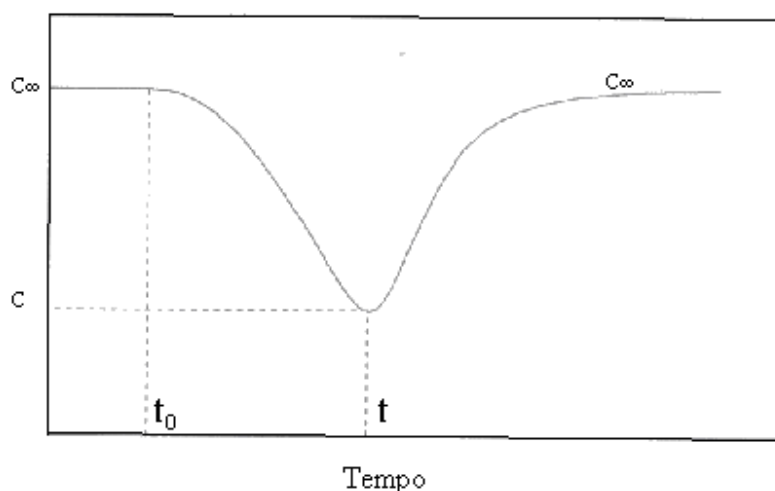


Figura 3.7: Variação da concentração de O_2 dissolvido com o tempo (Método dinâmico) (Humphrey & Taguchi, 1966).

Nestas condições, para o trecho sem aeração, observa-se que:

$$\frac{dC}{dt} = -Q_{O_2} \cdot X \quad (3.15)$$

O produto de $Q_{O_2} \cdot X$ deve ser constante durante este intervalo de tempo, o que permite a integração da Equação 3.14, obtendo-se:

$$C = C_{\infty} - Q_{O_2} \cdot X (t - t_0) \quad (3.16)$$

Esta equação prevê que a partir do instante t_0 ($C = C_{\infty}$), deve ocorrer uma variação linear de C com o tempo, reta esta cujo coeficiente angular é igual a $(-Q_{O_2}X)$, resultando assim, no valor de Q_{O_2} conhecendo-se o valor de X neste instante. Uma vez conhecido valor de $Q_{O_2}X$, é possível efetuar o cálculo do k_La de duas formas distintas: a primeira consiste em considerar que a concentração de O_2 dissolvido ao longo do processo fermentativo, varia muito lentamente, esperando que ao final da aplicação do método dinâmico, concentração de O_2 dissolvido volte ao valor original C_{∞} . Assim, supondo estado estacionário em relação a C , pode considerar $(dC/dt) = 0$, na Equação 3.14 e, portanto:

$$k_La = \frac{Q_{O_2} \cdot X}{(C_s - C_{\infty})} \quad 3.17$$

Esta metodologia deve ser aplicada apenas quando se tem valores de C_0 razoavelmente abaixo de C_s (concentração de O_2 dissolvido no líquido em equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio na interfase), caso contrário passa-se a obter valores de k_La absurdamente altos, pois se está dividindo o valor de $Q_{O_2}X$ por valores muito baixos. A segunda forma para o cálculo do k_La , consiste em empregar os dados obtidos no trecho ascendente da concentração de O_2 dissolvido, durante a qual a Equação 3.14 aplica-se na íntegra. Assim rearranjando a equação tem-se:

$$\frac{dC}{dt} = k_La \left(C_s - \frac{Q_{O_2} \cdot X}{k_La} \right) - k_La \cdot C \quad 3.18$$

Considerando novamente estado estacionário na Equação 3.14, no patamar que antecede a interrupção da aeração ($C = C_\infty$), pode se demonstrar que:

$$C_\infty = C_s - \frac{Q_{O_2} \cdot X}{k_L a} \quad 3.19$$

Introduzindo a Equação 3.19 na 3.18 tem-se:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_\infty - C) \quad 3.20$$

Esta equação pode ser integrada, lembrando que para o instante inicial de retomada da agitação e aeração, ou seja, para $t = t_0$ tem-se que $C = C_0$, obtendo-se:

$$\ln \left(\frac{C_\infty - C}{C_\infty - C_0} \right) = -k_L a (t - t_0) \quad 3.21$$

Desta forma, plotando-se $C = f(t)$, obtem-se uma reta, cujo coeficiente angular permite o cálculo do $k_L a$.

4.0. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Processo Fermentativo - Produção de AH

4.1.1. Microrganismos

Foram utilizadas três diferentes cepas de *Streptococcus*: *S. zooepidemicus* ATCC 39920, *S. equi* ATCC 39506 e o *S. equi* ATCC 6580, todas pertencentes ao grupo C (ATCC, Manassas, VA, USA), recomendadas na literatura para a produção de AH. As cepas nativas foram obtidas da American Type Culture Collection – ATCC na forma de culturas liofilizadas.

4.1.2 Manutenção e propagação do inóculo

A cultura estoque foi preservada na forma liofilizada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI (Paulínia/ SP). A cultura de trabalho foi mantida sob refrigeração em tubos de ensaio com rosca contendo 5 mL de meio TSA (*Trypticase Soy Agar – BBL*) inclinado, a partir da qual onde o microrganismo foi repicado e crescido por 48h a 37°C. A propagação do inóculo foi feita em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion - Difco*), incubados a 37°C por 48 h com agitação de 150 rpm. Foram feitos apenas dois repiques para garantir o mesmo nível de atividade celular.

4.1.3. Meio de fermentação

O meio utilizado para produção de AH foi o meio descrito na Tabela 4.1, que tem sua composição baseada nas principais fontes para o crescimento do microrganismo: fonte de carbono (glicose) e fonte de nitrogênio (extrato de leveduras) e alguns sais (Swann *et al.*,

1990). A solução de glicose foi preparada e autoclavada separadamente do restante do meio. O pH final é ajustado a 7,5, com NaOH 4N.

Tabela 4.1: Meio para crescimento dos microrganismos produtores de AH

Componentes	g.L ⁻¹ de água deionizada (*mg.L ⁻¹)
Glicose	10-35-60
Extrato de levedura	10-35-60
K ₂ SO ₄	1,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
Na ₂ SO ₄ .12H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	5*
FeSO ₄ .7H ₂ O	5*
MnSO ₄ .4H ₂ O	1,0*
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,0*
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1*
H ₃ PO ₄	1,0 mL

4.1.4. Separação do AH

A separação do AH do caldo de fermentação foi feita por precipitação com etanol, baseada no protocolo descrito por Nimrod *et al.* (1988), com modificações introduzidas neste trabalho. Em síntese, o caldo foi inicialmente centrifugado a 3200 rpm por 20 min. Após a remoção das células adicionou-se 1,5 volumes de etanol a 1,0 volume do sobrenadante, refrigerando-se a solução a 4°C durante 1 h para a precipitação do AH.

O precipitado foi recuperado e redissolvido em solução 0,15 M de cloreto de sódio (NaCl) + 0,1% de parahidroxibenzoico ácido metil éster (Aldrich - conservante) e adicionado de etanol para precipitação. O próximo precipitado é redissolvido em 0,15 M de NaCl + 1 g/L de carvão ativado + 40 g/L de terra diatomácea, agitado por 1 h a 4°C e filtrado a vácuo, o filtrado é então precipitado novamente com etanol. O precipitado é redissolvido e o AH é separado.

4.2. Influência da Esterilização na Solução Polimérica

Ensaio de esterilização do AH comercial foram feitos em autoclave a 121°C por 15 min, 30 min e 1 h para investigação dos efeitos da esterilização nas propriedades do AH produzido.

4.3. Seleção das Cepas

As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio (item 4.1.3), esterilizados a 121°C por 15 min. Estes foram inoculados com 10% v/v de inóculo, preparado conforme descrito no item 4.1.2. e incubados por 24 h com agitação de 150 rpm, temperatura 37°C e pH_{inicial} 7,5. Para cada linhagem foi avaliada a produção de AH, o consumo de glicose, pH e densidade ótica (DO) do meio e massa celular através dos respectivos perfis ao longo do tempo (amostragem de 2 em 2 h até 14 h e mais uma em 24 h).

4.4. Influência da Relação das Fontes de Carbono e Nitrogênio – Planejamento Fatorial Completo 2²

Este experimento foi realizado em *shaker* rotatório com frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio (item 4.1.3, Tabela 4.1), esterilizados a 121°C por 15 min. Estes foram inoculados com 10% v/v de inóculo, preparado conforme descrito no item 4.1.2. e incubados a 37°C por 24 h com agitação de 150 rpm. Esta etapa compreendeu o estudo da influência de duas variáveis na produção de AH, através de um planejamento estatístico fatorial, analisado pelo software *Statistic for Windows 5.0*, para determinação da variável mais significativa do processo. As variáveis independentes estudadas foram: concentração de glicose (fonte de carbono) e concentração de extrato de levedura (fonte de nitrogênio). A resposta determinada (variável dependente) para cada ensaio foi expressa em

termos de concentração de AH (item 4.101.1), viscosidade (item 4.13) e concentração celular (item 4.10.3).

A Tabela 4.2 apresenta os valores reais das variáveis correspondentes aos níveis inferior (-1) e superior (+1), para o planejamento estatístico fatorial completo 2^2 .

Tabela 4.2: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 .

VARIÁVEIS	NÍVEIS	-1	0	+1
Glicose (g/L)		10	35	60
Extrato de levedura (g/L)		10	35	60

A Tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 na forma codificada, com triplicata no ponto central.

Tabela 4.3: Matriz do planejamento fatorial 2^2

Ensaios	Glicose	Extrato de Levedura
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Todos os ensaios foram realizados em uma única batelada nas mesmas condições de temperatura 37°C, agitação 150 rpm e pH_{inicial} 7,5 e retirados ao final de 24 h. Cada um dos ensaios corresponde a um frasco de Erlenmeyer contendo meio conforme a Tabela 4.2.

4.5. Efeito da Adição de Lisozima

O efeito da adição de lisozima no meio foi investigado em fermentações conduzidas em *shaker* rotatório com frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio, esterilizados a 121°C por 15 min. Estes foram inoculados com 10% v/v de inóculo, preparado conforme descrito no item 4.1.2. e incubados a 37°C por 24 h com agitação de 150 rpm e pH_{inicial} 7,5.

A enzima lisozima EC3.2.1.17 (Sigma) foi adicionada ao meio de cultura em dois pulsos, de 20000 EU L⁻¹, quando a DO_{600nm} atingiu 0,8 e 1.2.

4.6. Efeito da Aeração Forçada

Os experimentos com aeração forçada foram realizados para investigar o efeito do excesso de oxigênio na fermentação. Os ensaios foram conduzidos em fermentador de 3 L do tipo BioFlo III (New Brunswick Scientific Co Inc.) à 37°C, pH_{inicial} 7,5, 150 rpm usando 2,5 L de meio, 10% v/v de inóculo (preparado conforme descrito no item 4.1.2), e taxa de aeração 2,0 vvm e comparados com os ensaios feitos em *shaker* rotatório com frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio, inoculados com 10% v/v, preparado conforme descrito no item 4.1.2. e incubados à 37°C, pH_{inicial} 7,5 e agitação de 150 rpm. As amostras foram retiradas ao final de 24 h e analisadas quanto à concentração de AH, viscosidade e viscoelasticidade da solução e massa molar do polímero.

4.7. Variação nos Níveis da Aeração Forçada e Agitação

Os ensaios foram conduzidos em fermentador de 3 L do tipo BioFlo III (New Brunswick Scientific Co Inc.) a 37°C, pH_{inicial} 7,5, usando 2,5 L de meio, 10% v/v de inóculo (preparado conforme descrito no item 4.1.2). As fermentações foram conduzidas em diferentes níveis de agitação (150, 250 e 400 rpm) e de aeração (0,5 e 2,0 vvm) As

amostras foram retiradas ao final de 24 h e analisadas quanto à concentração de AH, viscosidade e viscoelasticidade da solução e massa molar do biopolímero.

4.8. Corte da Aeração Forçada

Os experimentos foram conduzidos em fermentador de 5 L do tipo BioFlo III (New Brunswick Scientific Co Inc.) por 24 h à 37°C, aeração 2,0 vvm, 150 rpm e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 7,5 e usando 3,5 L de meio, 10% v/v de inóculo (preparado conforme descrito no item 4.1.2). No primeiro cultivo a aeração forçada foi cortada no início da fase exponencial (8 h) e no segundo no início da fase estacionária (16 h) do crescimento celular. Ao término do cultivo as amostras foram retiradas e analisadas quanto à concentração de AH, viscosidade e viscoelasticidade da solução e massa molar do biopolímero.

4.9. Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio (k_{La})

Foram feitas fermentações em reator do tipo Bioflo III, nas condições operacionais determinadas ao longo do desenvolvimento do trabalho. Temperatura 37°C, e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 7,5, 10% de inóculo v/v, agitação 150 rpm, vazão de ar de alimentação 2,0 vvm. O k_{La} foi determinado nos tempos de 0, 6, 12, 16 e 24 h de cultivo.

Para determinação do k_{La} do meio no tempo zero da fermentação, o inóculo foi adicionado (10 % v/v), e a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) no meio acompanhada através de um eletrodo de oxigênio a agitação foi ligada em 150 rpm e a vazão de ar de alimentação ajustada a 2,0 vvm até valores constantes de (OD). Ao atingir o valor máximo a aeração foi cortada e o decréscimo de oxigênio monitorado com o tempo (15 em 15 s) até valores próximos a zero. A aeração é ligada novamente e a vazão de oxigênio ajustada a 2,0 vvm, sendo o aumento da OD monitorado com o tempo (15 em 15 s).

4.10. Métodos Analíticos

4.10.1. Concentração do AH

4.10.1.1. Método Colorimétrico de Carbazol

A determinação da concentração de AH no meio de fermentação foi feita após a remoção das células e precipitação do AH. A concentração do AH foi determinada através de método químico, utilizando o reagente colorimétrico Carbazol (Dische, 1946). Esse método baseia-se no desenvolvimento de cor pela ação de compostos orgânicos como o reagente Carbazol, quando ácidos hexurônicos são previamente tratados com ácidos minerais. Após o aparecimento da coloração rosa, característica da complexação do ácido urônico com o Carbazol, a absorbância das soluções foi lida a 530nm em espectrofotômetro (Hitachi U 2001). A concentração do AH foi determinada através de uma curva de calibração previamente construída com o AH comercial 1% (Nikkol) tomado como referência (Anexo (B)).

4.10.1.2. HPLC

A concentração do AH foi determinada em termos de hialuronato de sódio (NaAH) por *high-performance liquid chromatography* (HPLC, Waters 510) trabalhando com um detector de índice de refração (Waters 410) e com a coluna OHPak SB-806M HQ, o análise foi conduzida a 40°C usando NaNO_3 0,1 M como fase móvel a uma vazão de 1mL/min., de acordo com protocolo descrito por Armstrong & Johns (1995). A curva padrão foi inicialmente preparada usando o HA fabricado pela Nikkol (1%). Porém analisando os picos do AH produzido, verificou-se que o pico obtido estendia-se do tempo de retenção 6 a 8 min. para 8 a 10 min., sendo estes últimos tempos característicos do hialuronato de sódio. Concluiu, portanto, que em decorrência da dissolução do precipitado com NaCl, o produto analisado continha uma mistura de ácido hialurônico e hialuronato de sódio. A curva de calibração do hialuronato e sódio (Hylumed® - Genzyme Corporation) foi então

construída (Anexo C).

4.10.2. Concentração de Glicose

A concentração de glicose no meio de fermentação foi determinada através de reação enzimática com a enzima glicose oxidase, utilizando-se o kit comercial (LABORLAB Produtos para Laboratórios Ltda). O procedimento consiste em adicionar a 20 µL de solução de glicose, 3 mL de solução reativa, incubar as soluções em banho termostático a 37°C, sob agitação por 10 min, ler a absorbância das soluções a 505nm, usando água como referência (branco do ensaio). A concentração de glicose é então determinada através de curva de calibração previamente construída a partir de solução de glicose de concentração 1mg/mL em água destilada, contida no kit, e as várias diluições preparadas. No Anexo (C) é apresentada a curva de calibração previamente determinada.

4.10.3. Concentração Celular

Foi determinada como massa celular seca por unidade de volume de amostra pelo método gravimétrico, que consiste em, após limpar e secar os tubos de ensaio a 60 °C por 12 h e pesá-los, acrescentar 10 mL de caldo fermentado, centrifugar a 3200 rpm por 20 min e descartar o sobrenadante. O precipitado é lavado com água por duas vezes e seco por 12 h a 60°C em estufa a vácuo. A massa celular seca é calculada pela diferença entre a massa do tubo de ensaio seco com amostra e a massa do tubo de ensaio seco sem amostra.

4.10.4. Densidade Ótica

A densidade ótica foi determinada nas amostras do caldo fermentado, com leitura direta da absorbância a 530nm em espectrofotômetro (Hitachi U 2001), previamente zerado com o caldo não fermentado, utilizando cubetas de quartzo de 3 mL.

4.10.5. Velocidade específica máxima de crescimento celular e fatores de rendimento $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$

A velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx.}}$) é calculada através do coeficiente angular da reta obtida da plotagem de $\ln (X/X_0)$ versus o tempo de fermentação e os fatores de rendimento são calculados através dos coeficientes das retas que correlacionam as variáveis obtidas na fase exponencial do crescimento celular.

4.11. Viscosidade Intrínseca

Os experimentos foram realizados com soluções diluídas do AH padrão e do AH obtido por fermentação. Os experimentos foram conduzidos em viscosímetro capilar (Fenske 200/U419), utilizando NaCl 0,15 M como solvente.

A viscosidade intrínseca foi determinada a partir do cálculo das viscosidades relativas, específicas, específica reduzida e inerente das amostras, definidas na Tabela 4.4. e graficando a viscosidade específica reduzida e a viscosidade inerente versus a concentração da amostra e extrapolando as retas para uma concentração igual a zero.

Tabela 4.4: Equações para a construção do gráfico da viscosidade intrínseca.

Viscosidades	Equações
Viscosidade Relativa	$\eta_{\text{rel.}} = t/t_0$
Viscosidade Específica	$\eta_{\text{esp.}} = \eta_{\text{rel.}} - 1 = t - t_0 / t_0$
Viscosidade Específica Reduzida	$\eta_{\text{esp. rel.}} = \eta_{\text{esp.}} / c$
Viscosidade Inerente	$\eta_{\text{iner.}} = \ln (\eta_{\text{rel.}}) / c$
Viscosidade Intrínseca	$\eta_{\text{int.}} = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{\text{iner.}}) = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{\text{esp. red.}})$

Onde: t = tempo de efluxo da solução polimérica

t_0 = tempo de efluxo do solvente

c = concentração da solução polimérica.

4.12. Massa Molar

A massa molar viscosimétrica média foi estimada através da relação com a viscosidade intrínseca, descrita pela Equação 4.1.

$$\eta = k (M_v)^a \quad (4.1)$$

Onde: k = constante dependente da geometria da ligação entre resíduos internos de cadeia polimérica

a = constante dependente do solvente utilizado

η = viscosidade intrínseca.

As constantes de Mark-Houwink adotadas foram $k = 0,016$ e $a = 0,841$, sendo estas indicadas para soluções de NaCl (Armstrong & Johns, 1995 e Armstrong *et al.*, 1997).

4.13. Viscosidade e Viscoelasticidade

A viscosidade e a viscoelasticidade foram determinadas usando Reômetro (Haake CV 20N) equipado com banho termostático e com módulo de placas paralelas oscilantes, para soluções de AH padrão e produzido por fermentação.

Para a determinação destas propriedades dinâmicas, o equipamento foi programado para trabalhar em dois métodos diferentes: o método dinâmico de cisalhamento permanente (determinação do comportamento viscoso – G'') e o método dinâmico de cisalhamento oscilatório (determinação do comportamento viscoelástico – G').

O método de cisalhamento permanente (determinação do comportamento viscoso), uma força é aplicada ao sistema com sentido constante e com valores de deformação que variam linearmente com o tempo. A substância analisada responde à variação de deformação previamente determinada, através de valores de cisalhamento correspondentes. Este par de resultados foi analisado por um programa estatístico, através de software adequado, possibilitando a construção da curva de escoamento e da curva de viscosidade. O

tratamento estatístico também fornece os principais modelos representativos do fluido não-newtoniano e suas respectivas reprodutibilidades em relação ao fluido estudado.

No método dinâmico de cisalhamento oscilatório (determinação do comportamento viscoelástico – G'), uma força com sentido variável é aplicada ao sistema, com valores de deformação que variam de forma senoidal com o tempo. O método é dividido em duas etapas, a primeira chamada de varredura de deformação e a segunda de varredura de frequência. Com o objetivo de empregar corretamente o método, foi necessária inicialmente, a determinação das faixas onde a amostra segue um comportamento viscoelástico linear. Neste sentido foi realizada uma varredura da deformação, onde os valores da frequência foram fixados e a deformação permaneceu variando dentro da faixa pré-estabelecida. Após a identificação da amplitude máxima de deformação a amostra foi submetida a amplas faixas de frequência neste valor. A componente elástica G' foi determinada em função da frequência expressa em termos da razão entre a amplitude máxima de tensão (σ_0) e a amplitude máxima de deformação (γ_0) e do ângulo de mudança de fase (δ) como definido pela Equação 4.2.

$$G' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cos (\delta) \quad (4.2)$$

Onde: (σ_0 / γ_0) é a razão da amplitude

δ = ângulo de mudança de fase

4.14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens do AH foram obtidas por MEV (*Digital Scanning Electron Microscope* LEO 982) e periféricos Metalizador (Emitec K550) e ponto crítico de secagem (Emitec K850). As análises foram realizadas na unidade da Embrapa - Meio Ambiente (Jaguariúna/SP)

As amostras (caldo de cultivo) foram filtradas em membranas de 0,22 μm (Millipore) e depois fixadas com glutaraldeído 0,1 M 1% a pH 7,3 por 1 h. As amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 3 vezes de 10 min. Após as amostras foram novamente fixadas com ósmio 0,1 M 1% e desidratadas com solução de água-acetona em varias concentrações por 10 min cada. Ao final desta preparação as amostras passaram pelo ponto crítico de secagem e pelo metalizador. Após a metalização as amostras foram observadas no microscópio.

4.15. Infravermelho

As análises foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Bomem MB Séries, Hartmann & Braun_Michelson, com uma resolução de 4 cm^{-1} e comprimento de onda variando de 4000,07 a 399,24 cm^{-1} .

5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção da Cepa

A seleção da cepa de *Streptococcus* para produção de AH foi feita através da análise dos parâmetros da fermentação e características reológicas do produto. Os parâmetros da fermentação analisados foram: velocidade específica máxima de crescimento celular, produtividades volumétrica e específica e fatores de rendimento do produto em relação ao substrato ($Y_{P/S}$), de massa celular em relação ao substrato ($Y_{X/S}$) e do produto em relação às células ($Y_{P/X}$). A caracterização reológica do AH foi feita através da sua viscosidade e viscoelasticidade.

5.1.1. Produção - parâmetros da fermentação

A Figura 5.1 apresenta os perfis de produção de AH, consumo de glicose e evolução da massa celular para as cepas de *Streptococcus* ATCC 39506, ATCC 6580 e ATCC 39920. Esses dados encontram-se tabelados no Anexo A.

Os resultados da Figura 5.1 mostram que a cepa ATCC 39920 foi a que apresentou maior produção de AH (437mg/L) em 24 h de fermentação. As cepas ATCC 39920 e 39506 apresentaram o mesmo período de fase logarítmica do crescimento celular (6 h) enquanto que para cepa ATCC 6580 a fase exponencial ocorreu entre 0 e 10 h, conforme apresentado na Figura 5.2.

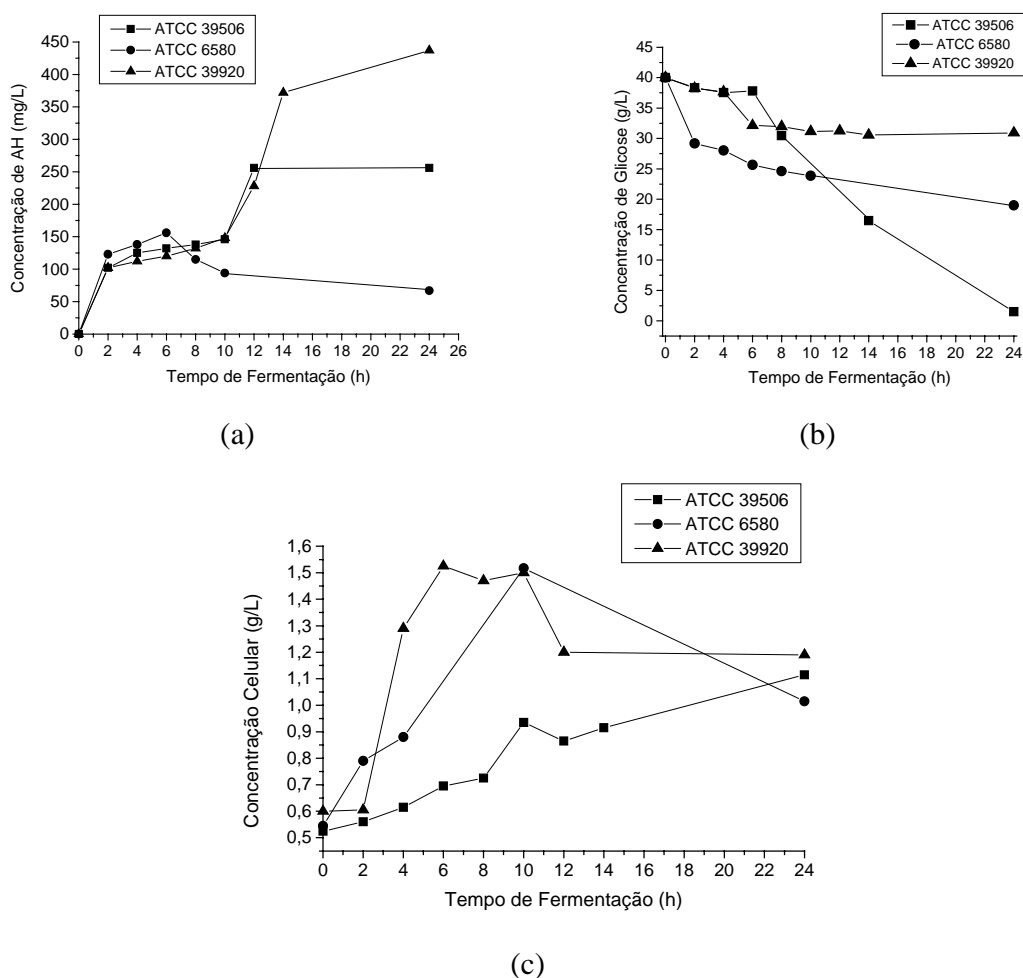


Figura 5.1: Perfis da produção de AH (a), consumo de glicose (b) e crescimento celular (c) para as cepas: *S. zooepidemicus* ATCC 39920, *S. equi* ATC 39506 e *S. equi* ATCC 6580, cultivadas em frascos de Erlenmeyer à temperatura de 37°C, pH_{inicial} 7,5 e meio de cultura com composição descrita na Tabela 4.1, item 4.1.3.

Os perfis de consumo de substrato (Figura 5.1 (b)) mostram que as cepas ATCC 39920 e 6580 não esgotaram a fonte de glicose no meio, indicando que a concentração de carbono calculada através da fórmula estrutural da glicose e do balanço de massa da reação decresceu de 15,99 para 11,99 e 7,6 g de C/L de meio, respectivamente. Sendo assim a fonte de carbono não é o fator limitante para produção de AH. A cepa ATCC 39506 consumiu praticamente toda a glicose do meio e a concentração de C atingiu 0,6 g/L em 24 h de cultivo.

A Figura 5.1 (c) mostra que a formação de massa celular ao final das 24 h de fermentação foi semelhante para as três cepas, mas com comportamentos distintos ao longo do tempo.

Baseando-se nos resultados apresentados no Anexo A e analisando os gráficos obtidos, observa-se 2 tipos distintos de cultivo. As cepas ATCC 6580 e 39506 apresentam formação do produto associado ao crescimento celular, a cepa ATCC 6580 atingiu a máxima concentração celular e de AH em 6 h e após diminuiu estes valores até 24 h, isto pode ter ocorrido devido ao acúmulo de massa celular no meio, modificando-o ou devido à limitação do meio com relação aos nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio) e a produção de algumas toxinas. A cepa ATCC 39920 apresentou formação de produto não associado ao crescimento celular, ou seja, a formação de produto é retardada, somente iniciando quando a reprodução celular diminui ou cessa.

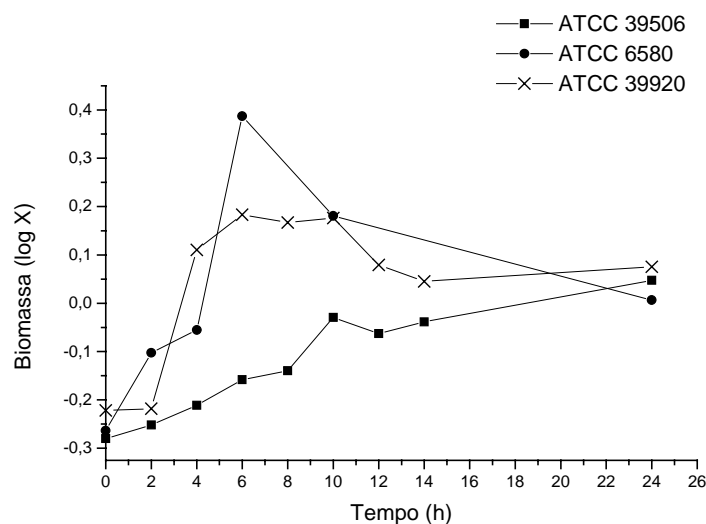


Figura 5.2: Perfil logarítmico do crescimento celular para as cepas: *S. zooepidemicus* ATCC 39920, *S. equi* ATCC 39506 e *S. equi* ATCC 6580.

A partir dos perfis de massa celular, produção de AH e consumo de substrato foram calculados os parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{\max}), produtividade específica e volumétrica e os fatores de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$), do substrato em célula ($Y_{X/S}$) e do ($Y_{P/X}$) para as três cepas estudadas, apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Produtividade específica e volumétrica, velocidade específica máxima de crescimento celular e fatores de conversão para as três cepas de *Streptococcus* em 24 h de cultivo.

Cepas	Produtividade de		μ_{\max}	$Y_{P/S}$	R^2	$Y_{X/S}$	R^2	$Y_{P/X}$	R^2
	AH								
	P_V	P_e							
ATCC 39506	0,0107	0,00959	0,0590	0,0035	0,6292	0,0203	0,9528	0,0623	0,9091
ATCC 6580	0,00279	0,00274	0,0833	0,0091	0,9794	0,4985	0,9244	0,0162	0,8318
ATCC 39920	0,0182	0,0153	0,2311	0,0023	0,7685	0,1060	0,5720	0,0184	0,9561
P _V = Produtividade volumétrica (g/L.h) P _e = Produtividade específica (g/g.h) μ_{\max} = velocidade máxima (h ⁻¹)					Y _{P/S} = g de AH/g de glicose Y _{X/S} = g de célula seca/g de glicose Y _{P/X} = g de AH/g de célula seca				

Observa-se pelos fatores de conversão ($Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$) que todas as culturas tendem a utilizar mais a fonte de carbono para formação celular do que para a formação de AH. A produção de AH e células competem pelas fontes de energia, porém o AH por ser um metabólito primário, ele é formado em paralelo ao crescimento celular (cepas ATCC 6580 e 39506), conforme biossíntese apresentada na Figura 3.3.

Os resultados da Tabela 5.1 mostram também que a cepa ATCC 39920 foi a que apresentou maior produtividade específica (15,30 mg/g.h) e volumétrica (18,2 mg/L.h) em 24 h de cultivo, com maior velocidade específica máxima de crescimento celular de $0,23 h^{-1}$ e fatores de conversão de substrato (glicose) em produto de ($Y_{P/S} = 0,0023$) e de substrato (glicose) em célula ($Y_{X/S} = 0,106$).

5.1.2. Separação e pré-purificação do AH

Após a fermentação as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação e o sobrenadante adicionado de etanol para precipitação AH. Na separação do AH foram testadas três razões volumétricas de etanol: sobrenadante (1:1; 1,5:1 e 2,5:1), buscando-se aumentar o rendimento da separação, as análises foram visuais, com relação a quantidade de AH precipitado. No entanto, os melhores resultados foram obtidos com a razão 1,5 volumes de etanol: 1 volume de sobrenadante, tal como descrito na patente de Nimrod *et al.* (1988).

5.1.3. Verificação do AH intracelular

Foram feitos ensaios adicionando-se tensoativos ao caldo de cultivo, obtido do final da fase exponencial de crescimento celular, visando liberar o AH presente no interior das células.

Foram utilizados os tensoativos: Polioxietileno 5 – lauril éter (C₁₂E₅) e Triton – X100 nas concentrações de 60 e 80% na proporção de 1:60 (1 mL de caldo:60 mL de tensoativo) e colocados para reagir por 5 h. O AH foi analisado pelo método de Carbazol. As amostras foram lidas, em intervalos de 30 min.

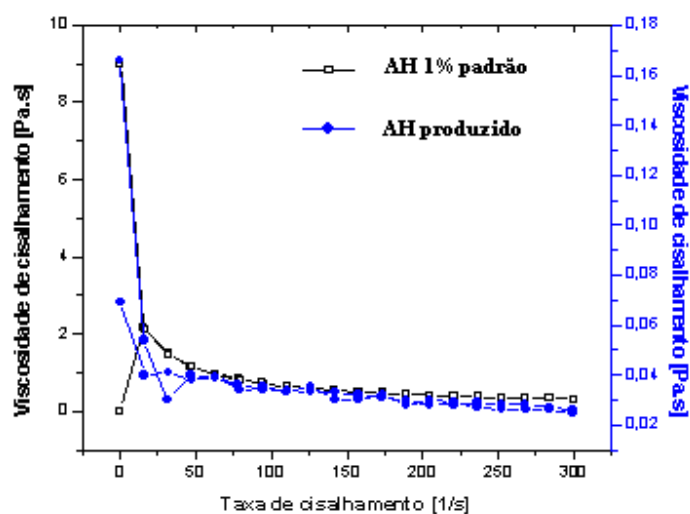
Os resultados obtidos com a adição de Triton-X100 ou o tensoativo não iônico C₁₂E₅ mostraram que não há AH intracelular em quantidades significativas. Portanto, todo o AH produzido é realmente extracelular, constituindo-se em componente capsular dos *Streptococcus*.

5.1.4. Caracterização reológica

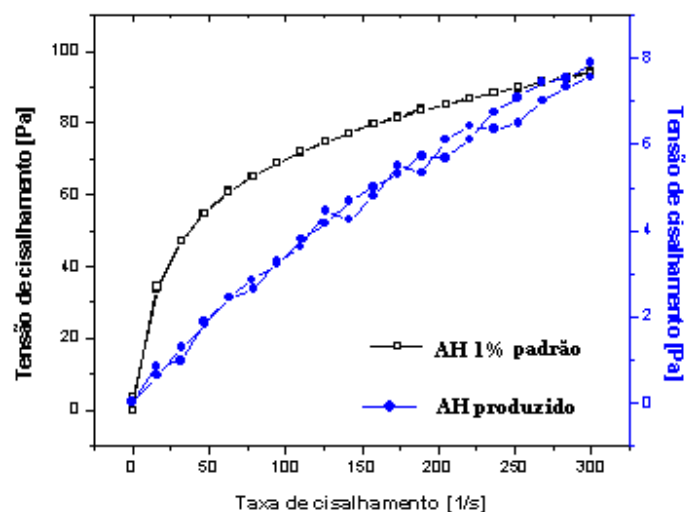
As soluções de AH produzidas a partir das fermentações das três cepas de *Streptococcus* foram caracterizadas quanto à viscosidade e a viscoelasticidade.

5.1.4.1. Viscosidade

A Figura 5.3 (a) apresenta as curvas de viscosidade obtida pelo método de cisalhamento permanente e a (b) as curvas de escoamento, ambas representativas do comportamento viscoso do AH padrão e do produzido pela cepa ATCC 39920. O AH produzido pelas cepas ATCC 39506 e 6580 apresentaram viscosidades menores que 5 cP, não detectável pelo Reômetro Haake CV 20N.



(a)



(b)

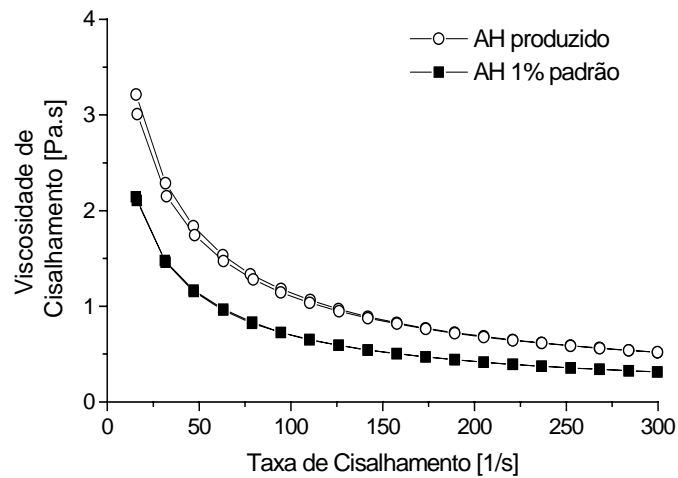
Figura 5.3: Comportamento reológico (a) viscosidade de cisalhamento e (b) tensão de cisalhamento, ambas em função da taxa de cisalhamento (curvas sobrepostas) para a solução de AH produzido pela cepa ATCC 39920 e para o padrão.

As curvas de viscosidade caracterizaram-se pela diminuição da viscosidade de cisalhamento a partir do aumento progressivo da taxa de cisalhamento e a curva de escoamento caracterizou-se pelo aumento da tensão de cisalhamento a partir do aumento progressivo da taxa de cisalhamento, o que representa um comportamento semelhante aos fluidos pseudoplásticos na faixa da taxa de cisalhamento estudada, embora para o AH produzido este comportamento seja muito próximo de um fluido Newtoniano, devido provavelmente a baixa concentração do produto. Dos resultados apresentados na Figura 5.3 (a) determina-se que a viscosidade limite (obtida a altas taxas de cisalhamento) da solução de 1% de AH padrão é 314 cP e da solução de AH produzido por fermentação com concentração de 0,4% é 42 cP.

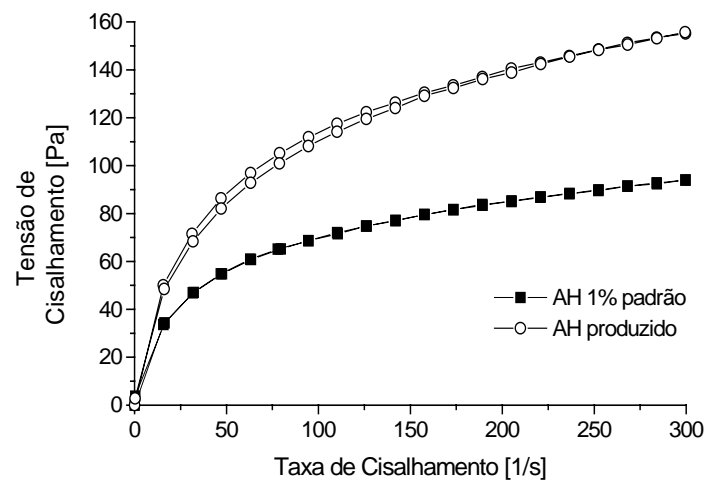
O modelo matemático que melhor representou o comportamento do fluido foi o de Bingham ($\tau = \tau_0 + \eta \cdot \dot{\gamma}$). Os parâmetros determinados foram $\tau_0 = 0,4220$ Pa e $\eta = 0,04227$ Pa.s.

Os pequenos volumes de meio e as perdas nos ensaios da seleção das cepas dificultaram a caracterização do polímero, na qual a cepa ATCC 39920 foi a única a apresentar características viscosas. Sendo assim, foi realizado um cultivo com esta bactéria em 4 frascos de Erlenmeyer de 1000 mL com 500 mL de meio, com as mesmas condições da etapa de seleção visando aumentar o volume total do meio de cultura (2 L) utilizado na precipitação e obtenção do AH.

A Figura 5.4 (a) apresenta as curvas de viscosidade, obtida pelo método de cisalhamento permanente, e (b) de escoamento, ambas representativas do comportamento viscoso para o AH padrão e para o produzido pela cepa ATCC 39920, com maior volume de meio.



(a)



(b)

Figura 5.4: Comportamento reológico (a) viscosidade de cisalhamento e (b) tensão de cisalhamento, ambas em função da taxa de cisalhamento (curvas sobrepostas) para a solução de AH produzido pela cepa ATCC 39920 e para o padrão.

As curvas de viscosidade obtidas para esta solução também se caracterizaram pela diminuição da viscosidade de cisalhamento a partir do aumento progressivo da taxa de

cisalhamento e a curva de escoamento caracterizou-se pelo aumento da tensão de cisalhamento a partir do aumento progressivo da taxa de cisalhamento, o que representa um comportamento semelhante aos fluidos pseudoplásticos na faixa da taxa de cisalhamento estudada. Dos resultados apresentados na Figura 5.4 (a) determina-se que a viscosidade limite (obtida a altas taxas de cisalhamento) da solução de 1% de AH padrão é 314 cP e da solução de AH produzido por fermentação com concentração de 3% é 518 cP.

O aumento nos valores da concentração de AH de 437 mg/L para 3,29 g/L e da viscosidade de 42 para 518 cP pode ser devido ao maior volume de meio de cultura (2 L) disponível para a separação, não tendo problemas com possíveis perdas e diluições da amostra e também pela aeração proporcionada pela maior interação do meio com o ar devido ao maior volume do frasco.

O modelo matemático de Ostwald ($\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$) que relaciona a tensão de cisalhamento com a taxa de deformação foi o que melhor representou o comportamento pseudoplástico, dentre os modelos reológicos clássicos, para ambas as soluções estudadas (padrão e produzido). Os parâmetros (n) e (k) foram 0,44 e 8,66 Pa.s para o AH padrão, e 0,51 e 9,72 Pa.s para o AH produzido pela cepa ATCC 39920 respectivamente.

Comparando os dados obtidos, gráficos da Figura 5.4 (a) e (b), com o comportamento reológico de fluidos puramente viscosos, tal como apresentado na Figura 3.5, observa-se que ambas as soluções de AH (padrão e produzido) apresentaram comportamentos semelhantes aos fluidos pseudoplásticos na faixa da taxa de cisalhamento estudada. Por outro lado, o parâmetro (n), chamado de índice de escoamento, como visto anteriormente, é um indicativo do quanto a solução estudada desvia-se do comportamento “ideal”, (fluido newtoniano). Sendo o valor de (n) obtido pelo modelo menor do que 1 tem-

se também a indicação de que o comportamento reológico dos fluidos estudados é do tipo pseudoplástico.

5.1.4.2 . Viscoelasticidade

Nos ensaios da seleção das linhagens, somente a cepa ATCC 39920 apresentou tendência ao comportamento viscoelástico.

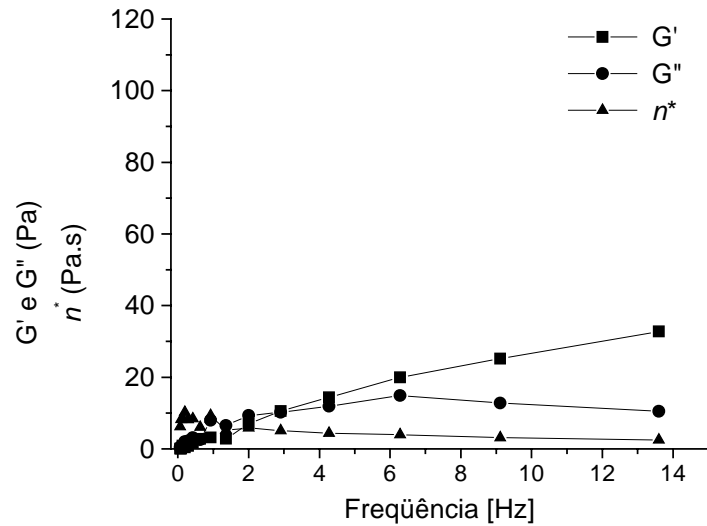
A primeira etapa desta caracterização foi a realização de uma varredura nos valores de deformação. Baseando-se nos dados obtidos determinou-se que a frequência a ser utilizada era de 1 Hz, tendo a deformação variado entre 1 e 30%. A partir deste teste, a amplitude de deformação foi fixada em 30% e fez-se uma varredura na frequência (0,01 a 9,62 Hz).

A Figura 5.5 (a) apresenta os resultados obtidos para a amostra padrão. Analisando os espectros obtidos com os dados experimentais, verifica-se que com o aumento da velocidade angular o módulo de rigidez (G' – componente elástica) e o módulo de dissipação (G'' – componente viscosa) aumentaram simultaneamente e a viscosidade complexa (η^*) diminuiu suavemente, comportamento este característico de soluções concentradas conforme pode ser visto no espectro viscoelástico da Figura 3.6. Observa-se também que a amostra do padrão possui características viscosas e viscoelásticas na mesma proporção.

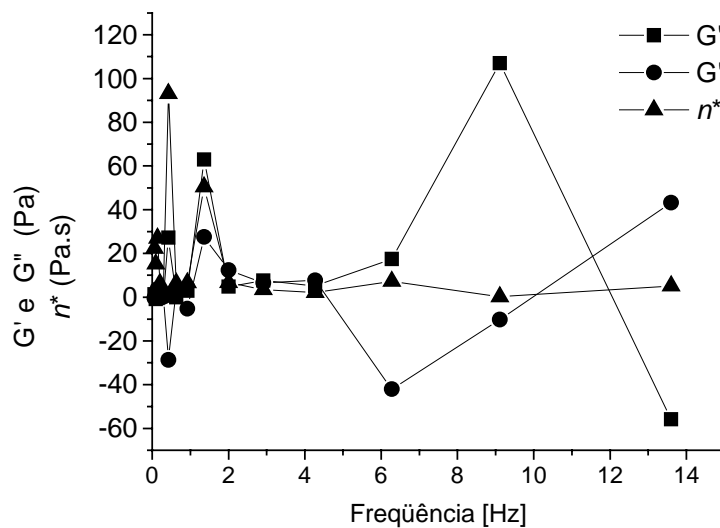
Para a amostra do AH produzido por fermentação pela cepa ATCC 39920 (Figura 5.5 - b), os dados experimentais apresentam-se oscilatórios, não definindo os módulos G' e G'' no espectro viscoelástico.

Apesar destas limitações, os resultados indicam um comportamento viscoelástico para o AH produzido por fermentação. Observa-se também que a ordem de grandeza dos

módulos G' e G'' da solução de AH produzido por fermentação é maior do que a correspondente aos módulos obtidos da solução de AH padrão.



(a)



(b)

Figura 5.5: Espectro viscoelástico com as medidas em escala logarítmica de G' , G'' e η^* em função da velocidade angular para a solução de AH (a) padrão e (b) produzido por fermentação com a cepa ATCC 39920.

5.1.4.3. Viscosidade Intrínseca

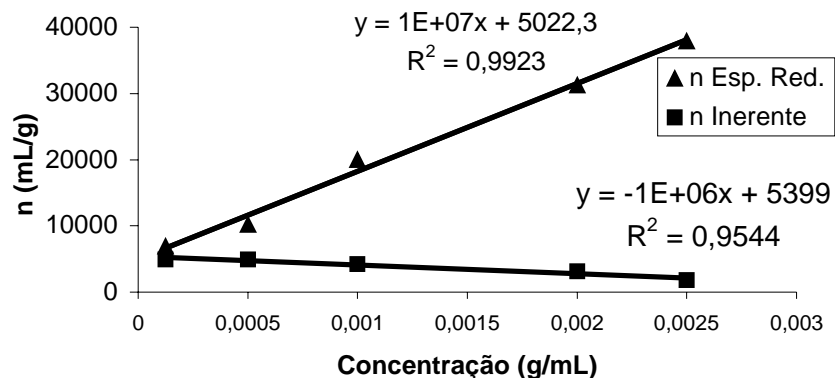
A viscosidade intrínseca foi determinada em viscosímetro capilar a partir dos valores das viscosidades específica reduzida e inerente, calculados pelas relações apresentadas na Tabela 4.4. Estes valores são mostrados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Viscosidades específica reduzida e inerente para soluções de AH padrão e produzido por fermentação da cepa ATCC 39920.

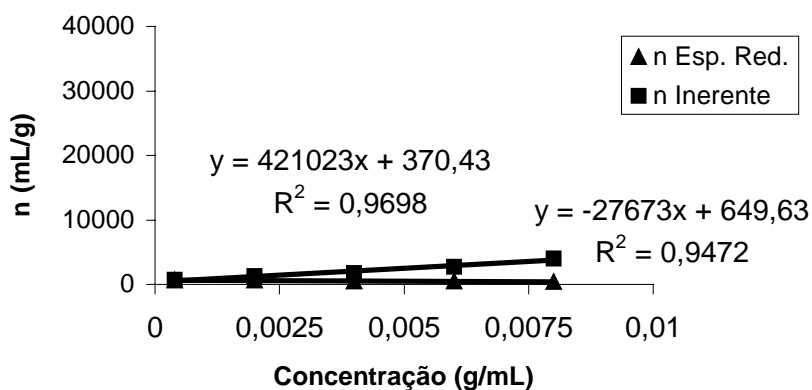
	Concentração da Solução Padrão (g/mL)					Concentração da Solução Produzida (g/mL)				
	0,000125	0,0005	0,001	0,002	0,0025	0,0004	0,002	0,004	0,006	0,008
Viscosidade Específica Reduzida (mL/g)	6877	10143	19958	31254	37864	712	1245	1746	2758	3980
Viscosidade Inerente (mL/g)	4964	4900	4221	3125	1824	626,5	624,9	519,2	477	436

Graficando-se os dados acima, obtem-se as Figuras 5.6 (a) e (b), a partir das quais a viscosidade intrínseca foi determinada mediante extrapolação das retas para concentração zero.

Extrapolando as duas retas para $x = 0$ obtém-se os valores das viscosidades intrínsecas $[\eta]$ de 5210 mL/g para a solução de AH padrão e 510 mL/g para a solução de AH produzido por fermentação.



(a)



(b)

Figura 5.6: Viscosidade específica reduzida e inerente versus a concentração de AH (a) padrão e (b) produzido pela cepa ATCC 39920 em solução de NaCl.

5.1.4.4. Massa Molar

Como a viscosidade intrínseca de uma solução polimérica está relacionada com a massa molar viscosimétrica média, calculou-se a massa molar do AH aplicando a equação de Mark-Houwink. Quando o valor da viscosidade intrínseca for maior do que 2960 mL/g, multiplica-se pelo fator 1,247 para corrigir o zero de cisalhamento, segundo Armstrong & Johns (1995) e Armstrong *et al* (1997). Sendo assim a viscosidade intrínseca do padrão corrigida é 6497,5 mL/g,

Massa molar do AH Padrão

$$n = k (M)^a$$

$$6497,5 \text{ mL/g} = 0,016 (M)^{0,841}$$

$$M = 4,6 \times 10^6 \text{ Da}$$

**Massa Molar do AH Produzido
(*shaker*)**

$$n = k (M)^a$$

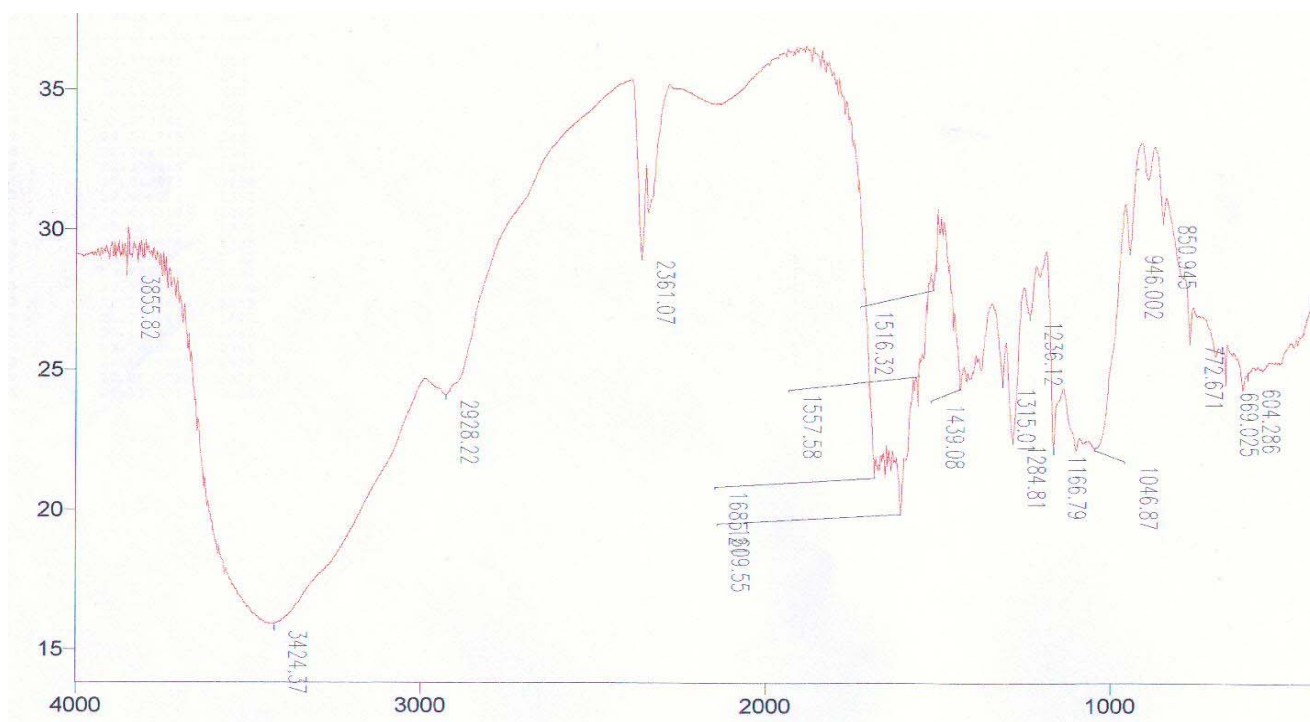
$$510 \text{ mL/g} = 0,016 (M)^{0,841}$$

$$M = 2,2 \times 10^5 \text{ Da}$$

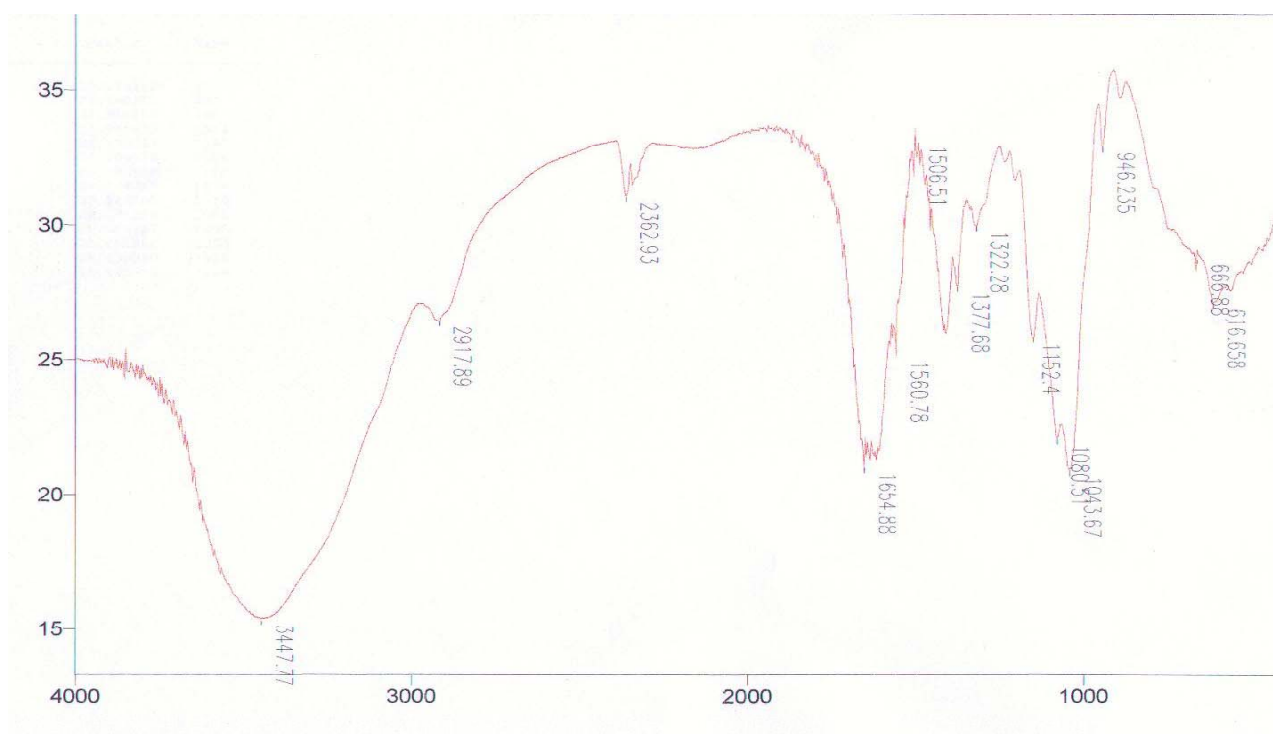
Baseado na análise dos parâmetros da fermentação (item 5.1.1) e da caracterização reológica (item 5.1.4), além da determinação da massa molar, conclui-se que a cepa ATCC 39920 é a mais promissora para a produção do AH nas condições experimentais testadas.

5.2. Identificação Molecular do Produto

Foram analisadas três amostras por espectrofotômetro de infravermelho: AH padrão, hialuronato de sódio padrão e AH produzido, para identificação e verificação da estrutura do composto produzido via microbiana, uma vez que nesta análise são identificados os grupos que estão presentes ou ausentes na molécula. A partir das Figuras 5.7 (a), (b) e (c) pode-se caracterizar os grupos atômicos das moléculas com as bandas de absorção que são específicas.



(a)



(b)

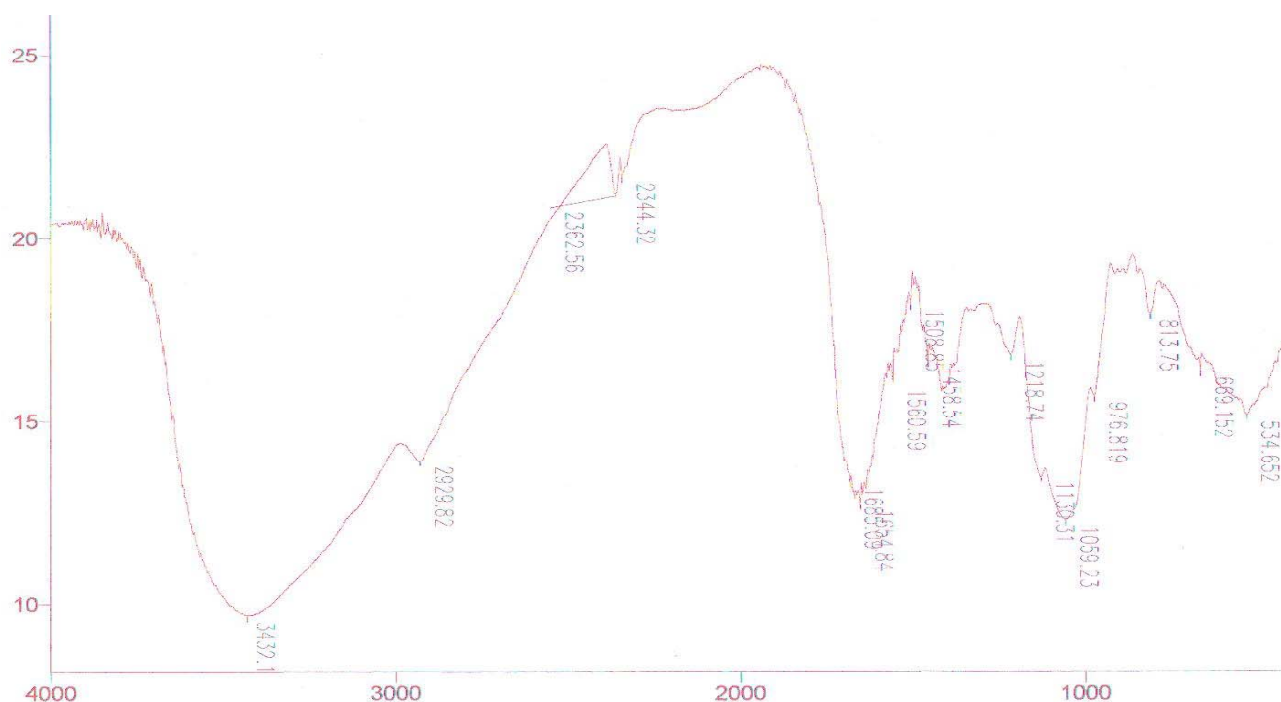


Figura 5.7: Espectro de infravermelho do (a) AH padrão, (b) Hialuronato de sódio padrão e (c) AH produzido - transmitância versus número de onda (cm^{-1}).

Alguns pontos a serem considerados para análise do espectro, frequências de alguns grupos dos compostos acima referidos:

δ C-O: álcool, éter, éster e ácido carboxílico de 1300 a 1000 cm^{-1} ;

δ C-N: aminas de 1350 a 1000 cm^{-1} ;

δ C-Cl: 785 a 540 cm^{-1} ;

ν C-H: alcanos com C sp^3 de 3000 a 2850 cm^{-1} ;

ν N-H: 3460 a 3420 cm^{-1} ,

Onde δ : dobramento

ν : estiramento

Observa-se na Figura 5.7 (a), (b) e (c) que a intensidade da transmitância do ácido produzido é menor do que das amostras padrões, o que significa que existem grupos externos na molécula do ácido produzido que estão interagindo com outros compostos do meio, fato justificado pela incompleta purificação da amostra analisada. Comprova-se também que o AH produzido apresenta-se na forma de hialuronato de sódio, uma vez que foi homogeneizado em solução de cloreto de sódio.

A partir da identificação do AH na forma de hialuronato de sódio as determinações de concentração foram feitas baseadas em curvas de calibração com hialuronato de sódio.

5.3 Efeitos da Esterilização

Após diluição das amostras de AH esterilizadas, até uma concentração bem baixa de 0,411mg/mL, mediu-se o tempo de efluxo destas amostras no viscosímetro capilar de Fenske, para o cálculo das viscosidades: relativa, específica, específica reduzida e inerente. O mesmo foi realizado com uma amostra de AH sem esterilizar. Os resultados são mostrados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Viscosidades das amostras de AH autoclavadas e não autocavadas

Tempo Viscosidade	Autoclavada			Não Autoclavada
	15'	30'	60'	0'
η_{rel}	2,01	1,28	1,16	2,18
η_{esp}	1,01	0,28	0,16	1,18
$\eta_{esp, red}$	2457,4	681,3	390,2	2871
η_{iner}	1658,6	600,6	316,1	1896,2

Dos resultados obtidos podem-se observar alterações expressivas nos valores das viscosidades determinadas quando o tempo de autoclavagem a 121°C excedeu 15 min, em relação às amostras não autoclavadas. Essas alterações indicam que a exposição à alta temperatura produz quebra da molécula do polímero, reduzindo assim a sua massa molar, com conseqüente redução da sua viscosidade e alterações na sua viscoelasticidade. O tempo de esterilização de 15 min a 121°C, pode, portanto ser usado na esterilização do AH produzido.

5.4. Influência das Concentrações das Fontes de Carbono e Nitrogênio na Produção de AH

Os resultados aqui apresentados foram obtidos com a Cepa ATCC 39920, utilizando glicose como fonte de carbono e extrato de leveduras como fonte de nitrogênio. Os dados experimentais obtidos foram analisados em relação à concentração de AH e celular e viscosidade das soluções, através de planejamento estatístico de experimentos e análise de superfície de resposta, para os níveis de significância de 95 e 90 %.

5.4.1. Concentração celular

Os ensaios foram realizados em duplicata, e as amostras são correspondentes aos ensaios da Tabela 4.3.

A influência das concentrações iniciais de fonte de carbono (glicose) e de fonte nitrogênio (extrato de levedura) foi analisada e a Tabela 5.4 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca (g/L). Os números com asterisco são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95% e 90%.

Tabela 5.4: Efeitos estimados para a resposta massa celular seca.

	Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média/Interação	0,830	0,0157	52,7450	0,000
(1)Glicose	0,035	0,0416	0,8406	0,489
(2)Extrato de levedura	0,305*	0,0416*	7,3258*	0,018*
1 com 2	0,045	0,0416	1,0808	0,392

A Figura 5.8 apresenta a superfície de resposta obtida para a massa celular onde se observa que aumentando as concentrações de extrato de levedura (60g/L) e de glicose (60g/L) aumenta a concentração de massa celular seca, sendo que o efeito da concentração de extrato de levedura (0,305) é muito mais significativo na resposta massa celular seca do que a concentração de glicose que apresentou efeito 10 vezes menor (0,0305). No entanto a glicose, mesmo em menor nível é muito importante para o processo.

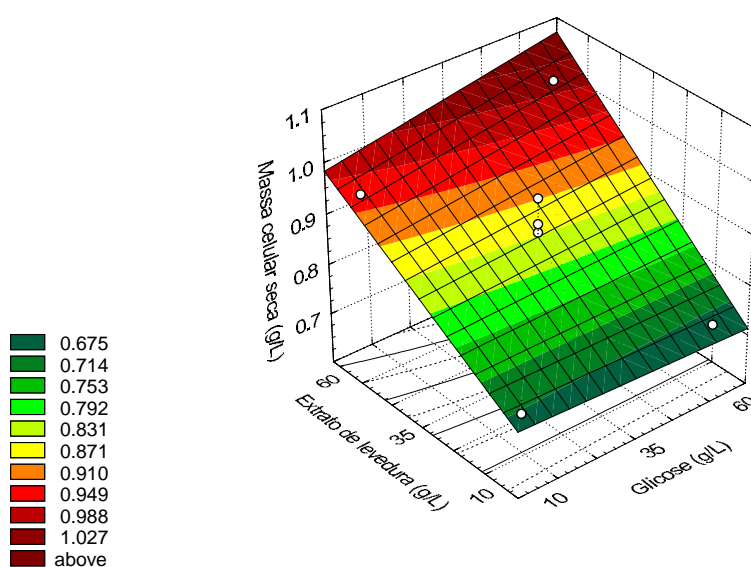


Figura 5.8: Superfície de resposta para a massa celular seca

5.4.2. Concentração de hialuronato de sódio (NaAH)

A influência das concentrações iniciais de fonte de carbono (glicose) e de fonte nitrogênio (extrato de levedura) foram analisadas e a Tabela 5.5 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta concentração de NaAH (g/L). Os números com asterisco são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95%.

A concentração do ácido hialurônico produzido nas condições descritas na Tabela 4.3, foi determinada a partir de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) como descrito no item 4.10.1.2.

Tabela 5.5: Efeitos estimados para a resposta concentração de NaAH

	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média/Interação	0,8921	0,0852	10,4630	0,009
(1)Glicose	0,4563	0,2255	2,0231	0,180
(2)Extrato de levedura	0,9744*	0,2255*	4,3200*	0,049*
1 com 2	-0,1846	0,2255	-0,8188	0,498

Na Figura 5.9 a superfície de resposta indica que aumentando as concentrações de extrato de levedura (60g/L) e de glicose (60g/L) aumenta a concentração de AH, sendo que o efeito da concentração de extrato de levedura (0,9744) é mais significativo na resposta concentração de NaAH do que o concentração de glicose que apresentou um efeito 2 vezes menor (0,4563).

Analisando a Tabela 5.5, confirma-se que o extrato de levedura tem maior influência na resposta concentração de NaAH, pois esta variável apresenta o $p < 0,05$ o que representa uma variável estatisticamente significativa a um intervalo de confiança de 95% e 90 %.

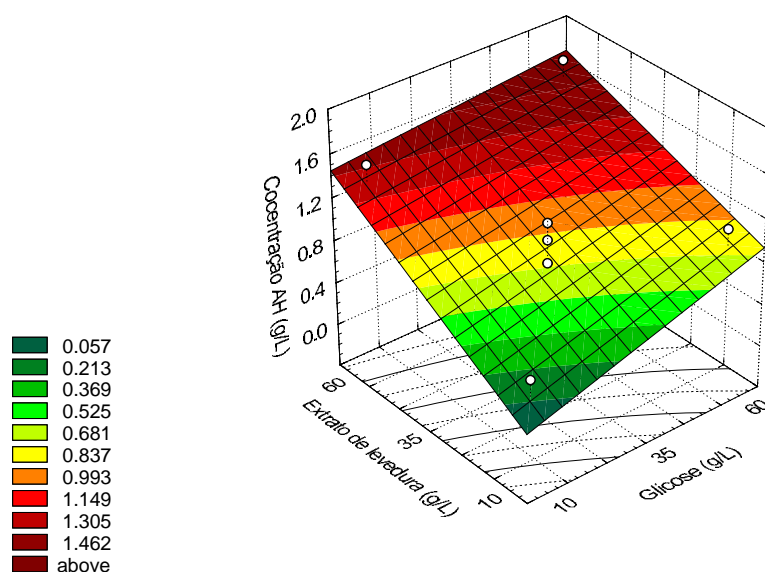


Figura 5.9: Superfície de resposta para concentração do NaAH produzido.

5.4.3. Viscosidade

A influência das concentrações iniciais de fonte de carbono (glicose) e de fonte nitrogênio (extrato de levedura) foi analisada e a Tabela 5.6 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta viscosidade limite (cP). Os números com asterisco são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95% e 90%.

As viscosidades das soluções de ácido hialurônico obtidas após a separação e suspensão em NaCl (item 5.1.5.), foram determinadas a partir do Rêometro Haake CV20 como descrito no item 4.13.

Tabela 5.6: Efeitos estimados para a resposta viscosidade

	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média/Interação	0,063	0,002	21,823	0,029
(1)Glicose	0,015	0,007	2,121	0,074
(2)Extrato de levedura	0,063*	0,007*	8,909*	0,026*
1 com 2	0,004	0,007	0,565	0,085

A Figura 5.10 apresenta a superfície de resposta viscosidade. Nesta Figura observa-se que aumentando as concentrações de extrato de levedura (60g/L) e de glicose (60g/L) aumenta viscosidade, sendo que o efeito da concentração de extrato de levedura (0,063) é mais significativo na resposta viscosidade do que concentração de glicose que apresentou um efeito 4 vezes menor (0,015).

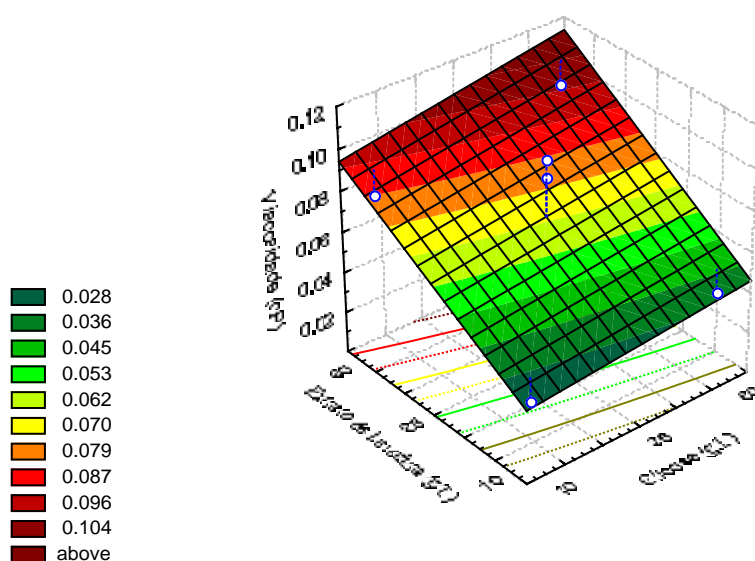


Figura 5.10: Superfície de resposta para viscosidade limite do AH produzido.

5.5. Influência da Adição de Lisozima

A Tabela 5.7 mostra a influência da adição de lisozima quando a densidade ótica ($DO_{600\text{ nm}}$) do meio atingiu 0,8 e 1,2 em comparação com a fermentação sem lisozima. Os resultados, apresentados pelo nosso grupo em Ogrodowski *et al.* (2005), mostram que a adição de lisozima diminui a concentração de AH produzido. Esta tendência contradiz os resultados de Kim *et al.* (1996) provavelmente devido a diferença da cepa bacteriana e das condições da fermentação. Por outro lado, o AH obtido com a adição da lisozima no meio apresenta propriedades viscoelásticas, indicando massa molar elevada. Este efeito é devido

provavelmente ao *stress* que a cepa de *Streptococcus* é submetida, pois a lisozima tende a destruir a parede celular e então o microrganismo reage protegendo-se a si mesmo produzindo a cápsula de AH. A ação da lisozima pode também contribuir para o deslocamento do equilíbrio da reação, devido à natureza proteolítica da enzima, que tenderia a limpar a parede celular fazendo com que a extrusão do AH aumentasse.

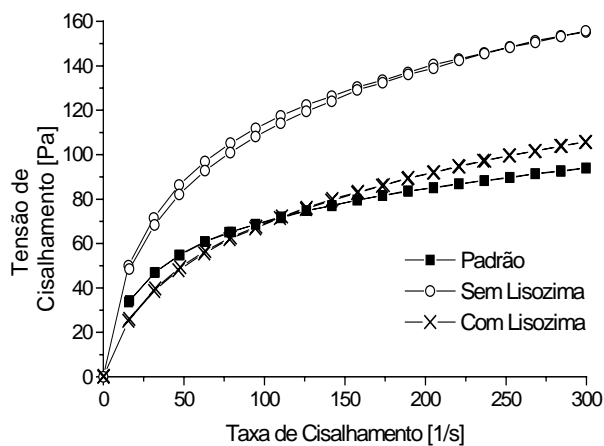
Tabela 5.7: Efeito da adição de lisozima na produção e nas propriedades do ácido hialurônico produzido por *S. zooepidemicus*.

Lisozima (UE L⁻¹)	AH (g L⁻¹)	η_{∞} (cP)	G' (Pa)	Massa Molar (Da)
0	2,43	518	ausente	2,20 x 10 ⁵
20000	2,12	353	31,5	4,97 x 10 ⁵

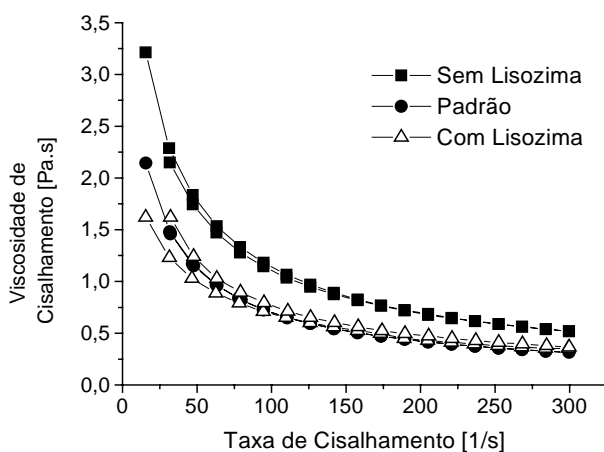
η_{∞} - Viscosidade Limite

G' - Viscoelasticidade (módulo elástico)

As curvas reológicas obtidas para o AH padrão e produzido por fermentação são mostradas na Figura 5.11. As curvas mostram um comportamento pseudoplástico para ambas as soluções de AH. O comportamento assintótico das curvas permitiu a determinação da viscosidade limite η_{∞} , a qual decresceu de 518 para 354 cP com a adição de lisozima. Em ambos os casos, a viscosidade limite do AH produzido nos ensaios de fermentação foi maior que a do AH padrão (314 cP).



(a)



(b)

Figura 5.11: Curvas reológicas do AH produzido por via microbiana, com e sem adição de lisozima em comparação com o padrão. (a) curva de escoamento e (b) curva de viscosidade.

Embora apresentando menor viscosidade, a solução de AH obtido com a adição da lisozima apresentou viscoelasticidade. A Figura 5.12 descreve o resultado obtido da medida dinâmica para a determinação da viscoelasticidade das soluções, através dos módulos calculados G' (elástico) e G'' (viscoso). Os resultados mostram um comportamento não

definido para o AH produzido na ausência de lisozima. Pode-se observar que para frequências acima de 1,5 Hz, o componente elástico G' é maior que o componente viscoso G'' para a solução de AH produzido com a interferência da lisozima. Assim o AH produzido é altamente elástico. Esse comportamento é semelhante ao do AH padrão, inclusive quanto aos valores absolutos do módulo G' .

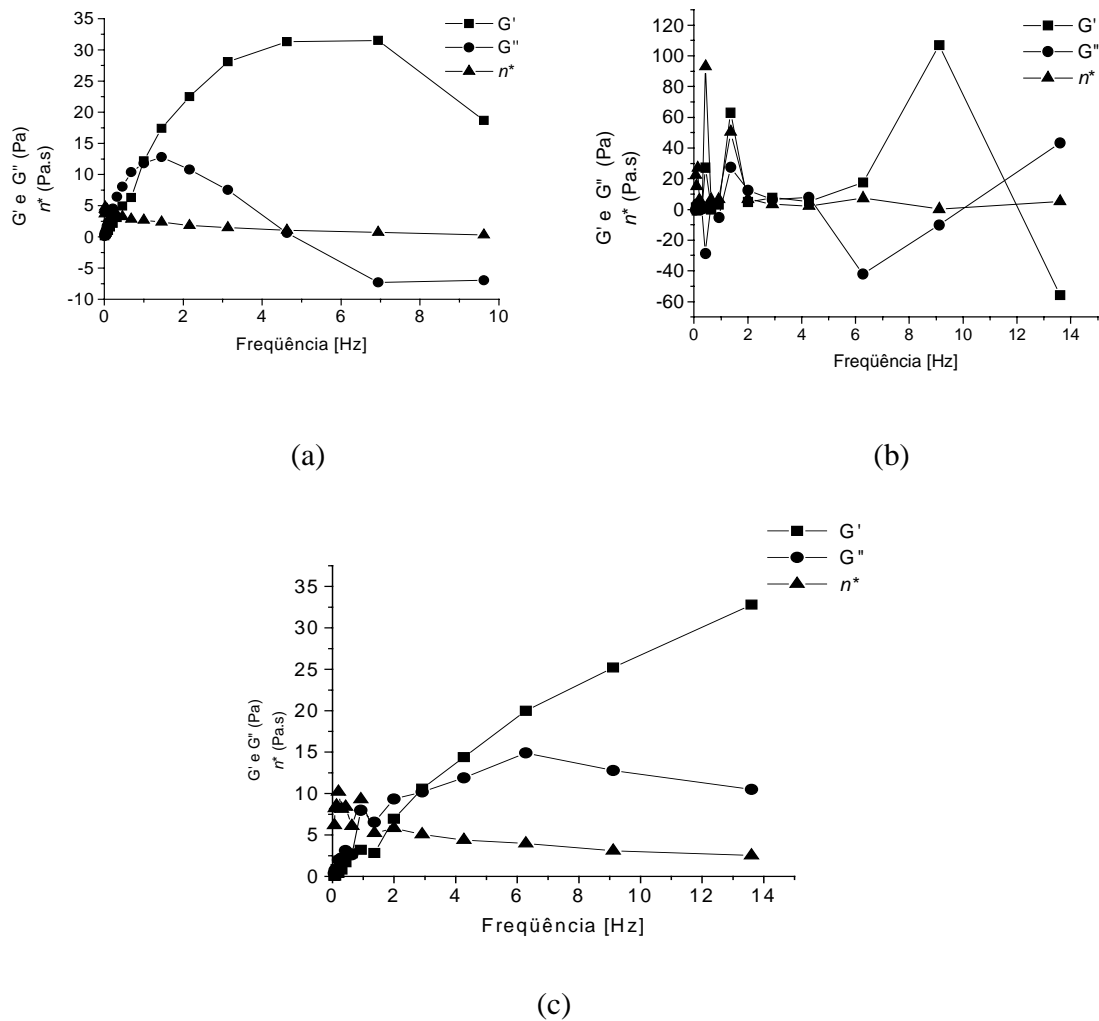


Figura 5.12: Módulo G' (componente elástica), módulo G'' (componente viscosa) e viscosidade complexa η^* do ácido hialurônico em função da frequência, (a) fermentação com lisozima (b) sem lisozima e (c) padrão.

O AH produzido com adição de lisozima pode ser comparado a um sólido viscoelástico, desde que a amostra deformada retorne a suas coordenadas originais, como uma mola, após a tensão ser diminuída. Quando frequências maiores do que 7 Hz são aplicadas, a estrutura elástica rompe e assim o valor de G' decresce. Observa-se também que o AH produzido deforma-se expressivamente com o cisalhamento, uma vez que a viscosidade complexa η^* decresce com o aumento da frequência. Esta é uma característica comum em soluções poliméricas concentradas.

5.6. Influência da Aeração

A influência da aeração foi estudada a partir de experimentos conduzidos em fermentador BioFlo III, com aeração forçada, tal como descrito no item 4.6 e comparando os resultados com a aeração natural, obtida em frascos de Erlenmeyer (item 4.4). Os resultados obtidos foram analisados em relação aos parâmetros cinéticos da fermentação (Tabela 5.8) e ao comportamento reológico do AH (Tabela 5.10) obtido. Os perfis cinéticos de consumo de substrato, produção de AH e massa celular, pH e oxigênio dissolvido (OD) de estão apresentados na Figura 5.13.

Tabela 5.8: Comparação dos parâmetros cinéticos da produção de AH com aeração forçada de 2,0 vvm e natural.

Aeração \ Parâmetros	μ_{\max}	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$
2,0 vvm	0,240	0,0890	0,1600	0,3948
Natural	0,231	0,0023	0,1060	0,0184

μ_{\max} = velocidade máxima (h^{-1})

$Y_{P/S}$ = g de AH/g de glicose

$Y_{X/S}$ = g de célula seca/g de glicose

$Y_{P/X}$ = g de AH/g de célula seca

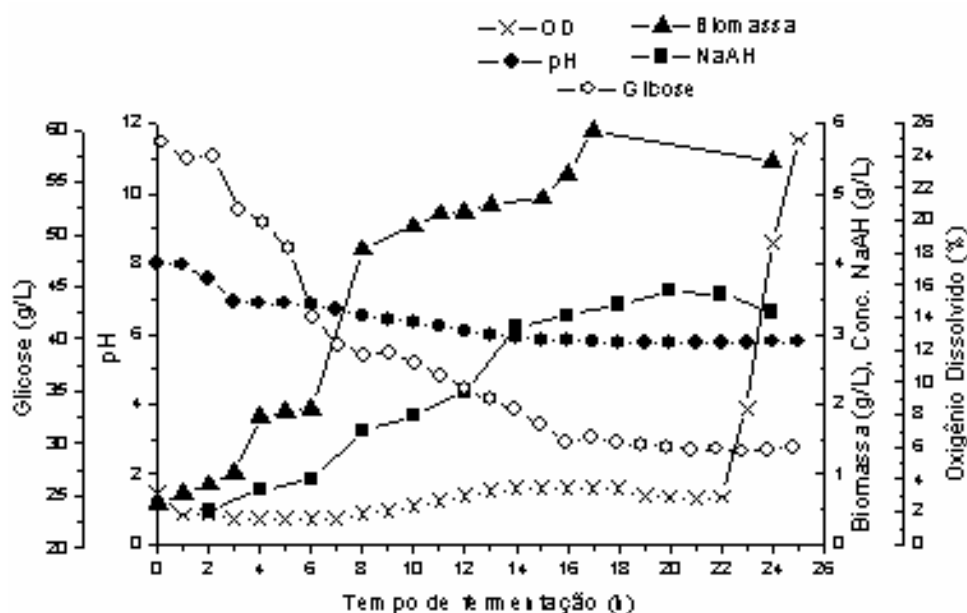


Figura 5.13: Perfis cinéticos do pH, OD e concentrações de massa celular, substrato e produto com aeração contínua de 2,0 vvm (sem corte de oxigênio).

O excesso de oxigênio resultante da aeração forçada (2,0 vvm) durante a fermentação aumentou a produção de AH para 3,75 g/L, quando comparada com a produção de AH em frascos de Erlenmeyer (aeração natural) 3,29 g/L. No entanto, não há evidências se o AH aumenta com a concentração de oxigênio devido à maior formação de ATP ou células, ou devido ao stress causado no microrganismo, uma vez que os *Streptococcus* são anaeróbios facultativos.

Observa-se também que na Figura 5.13 não houve o consumo total da glicose do meio. De acordo com a Figura 5.9, observa-se que uma menor quantidade de glicose reduz a produção de AH. Esses resultados sugerem que com a produção de AH e formação de uma cápsula na superfície externa das células, há limitações difusivas dos nutrientes para o interior da célula, necessitando por isso de uma quantidade maior de glicose no meio. O entendimento dessas limitações requer um estudo mais aprofundado, incluindo também a

quantificação do nitrogênio total e análises dos intermediários do metabolismo, para se determinar quais os fatores que limitam realmente o processo.

A Figura 5.14 apresenta o efeito da aeração forçada de 2,0 vvm em 24 h de cultivo, sobre as curvas de viscosidade do AH produzido, em comparação com o AH obtido com aeração natural e o AH padrão.

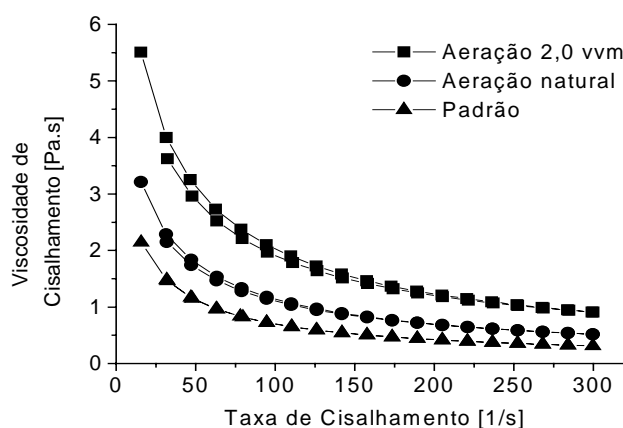


Figura 5.14: Curvas de viscosidade do AH produzido com aeração 2,0 vvm (Bioflo III), aeração natural (frascos de Erlenmeyer) e o AH padrão.

Somente propriedades viscosas foram identificadas na solução de AH obtida com aeração natural. O AH produzido sem adição de oxigênio não apresentou o comportamento viscoelástico e a viscosidade limite aumentou de 518 para 913 cP, quando a aeração passou de natural para 2,0 vvm e o AH produzido foi viscoelástico, conforme Tabela 5.9.

Como pode ser observado na Figura 5.14, as curvas apresentam o mesmo comportamento reológico, porém o AH produzido com aeração forçada é mais viscoso que o obtido com aeração natural até mesmo em relação ao padrão.

A Tabela 5.9 e a Figura 5.15 apresentam a evolução da concentração, viscosidade e viscoelasticidade ao longo das 24 h de cultivo com aeração 2,0 vvm. Ressalta-se que para a

obtenção desses resultados o AH foi previamente separado do caldo de fermentação. Analisando os gráficos observa-se que a concentração, a viscosidade e a viscoelasticidade crescem gradualmente ao longo do tempo de fermentação e para as frequências maiores do que 1,5 Hz, o componente elástico G' é maior do que o componente viscoso G'' em todos os tempos analisados (8, 16 e 24 h).

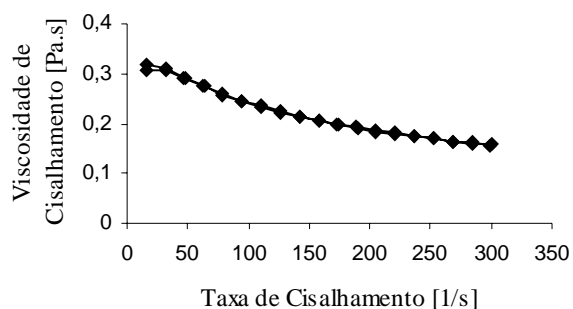
As propriedades reológicas são fortemente influenciadas pela massa molar dos polímeros de cadeia longa, então a magnitude do módulo G' corresponde à massa molar das cadeias de AH, uma comparação de valores destes parâmetros nos dá uma medida indireta da massa molar do AH, Tabela 5.9. A Figura 5.16 demonstra que a elasticidade e conseqüentemente a massa molar são diferentes para as soluções obtidas nos três tempos de fermentação. A massa molar do AH é maior nas soluções obtidas em 24 h ($G' = 73,1$ Pa) seguidos pelos tempos de 16 e 8 h. O gráfico da intersecção da viscosidade específica reduzida e inerente utilizados para o cálculo da massa molar está apresentada no anexo E (aeração 2,0 vvm) e Figura 5.6 (b) (aeração natural).

Tabela 5.9: Efeito da aeração forçada na produção e nas propriedades do ácido hialurônico produzido por *S. zooepidemicus*.

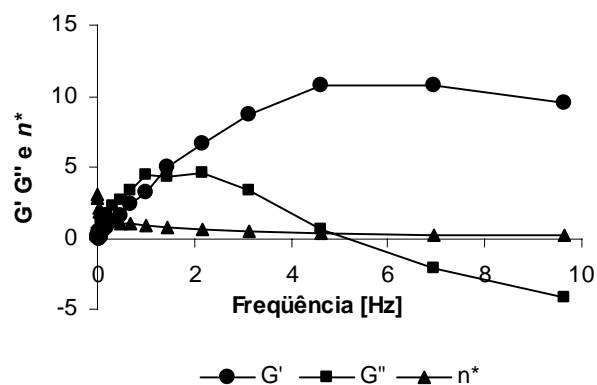
Condições	Tempo (h)	AH (g L^{-1})	η_{∞} (cP)	G' (Pa)	Massa Molar (Da)
Aeração 2,0 vvm	8	2,09	157	10,8	-
	16	2,84	585	46,1	-
	24	3,7	913	73,1	$3,2 \times 10^6$
Aeração natural	24	2,43	518	Ausente	$2,2 \times 10^5$

η_{∞} - Viscosidade Limite

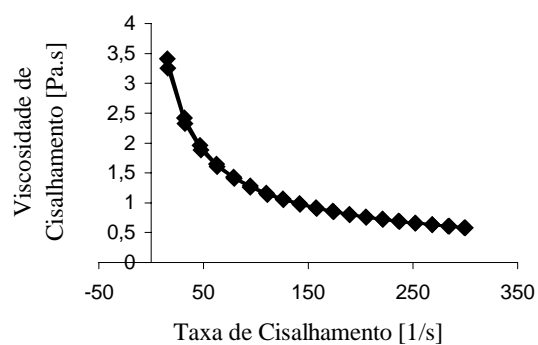
G' - Viscoelasticidade (módulo elástico)



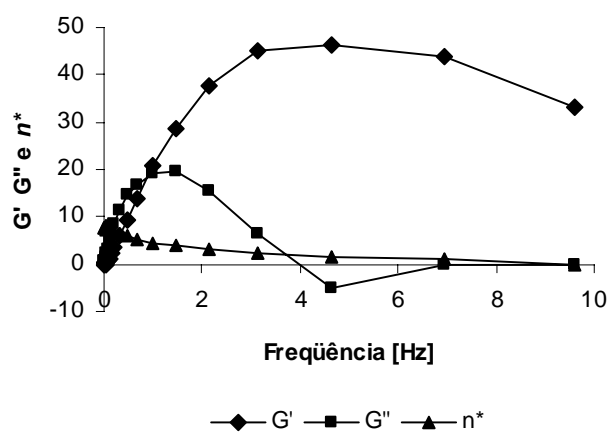
(a)



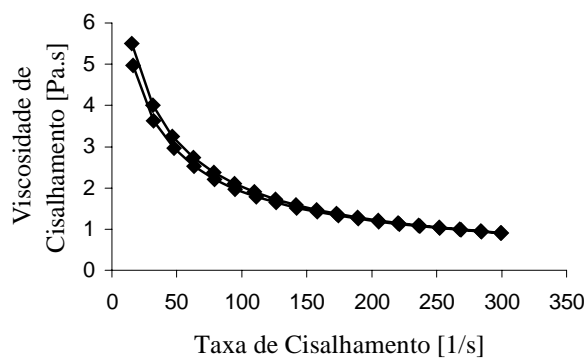
(b)



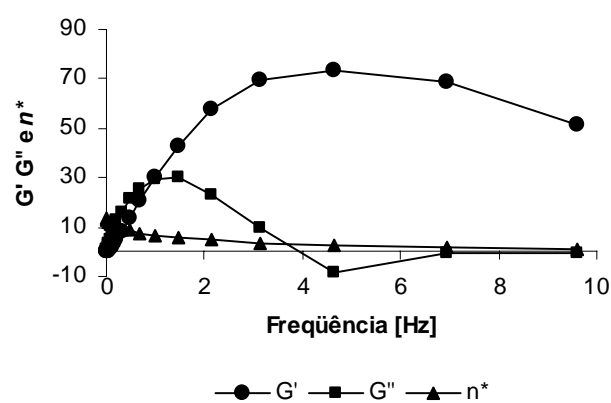
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 5.15: Caracterização reológica e viscoelástica do ácido hialurônico produzido por via microbiana com aeração de 2,0 vvm, (a) e (b) para 8 h, (c) e (d) para 16 h e (e) e (f) para 24 h de cultivo.

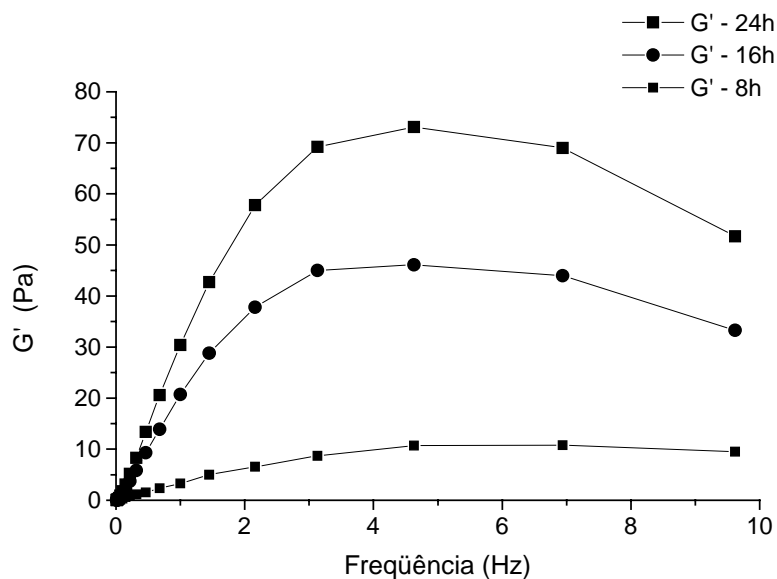


Figura 5.16: Comparação do módulo elástico G' para os tempos de 8, 16 e 24 h, para a solução de AH obtida por via microbiana com aeração de 2,0 vvm.

5.6.1. Comparação das fermentações com adição de lisozima e aeração forçada

Esta comparação pode ser feita também entre os valores do módulo elástico G' , obtidos das fermentações com a adição de lisozima e com aeração de 2,0 vvm, Figura 5.17. Onde se observa que a elasticidade (módulo G') e a massa molar são diferentes. A massa molar do AH obtido com aeração de 2,0 vvm ($G' = 73,1$ Pa) é maior do que a com adição de lisozima ($G' = 31,5$ Pa). Em ambos os casos as propriedades viscoelásticas são maiores que a do AH padrão ($G' = 25,3$ Pa).

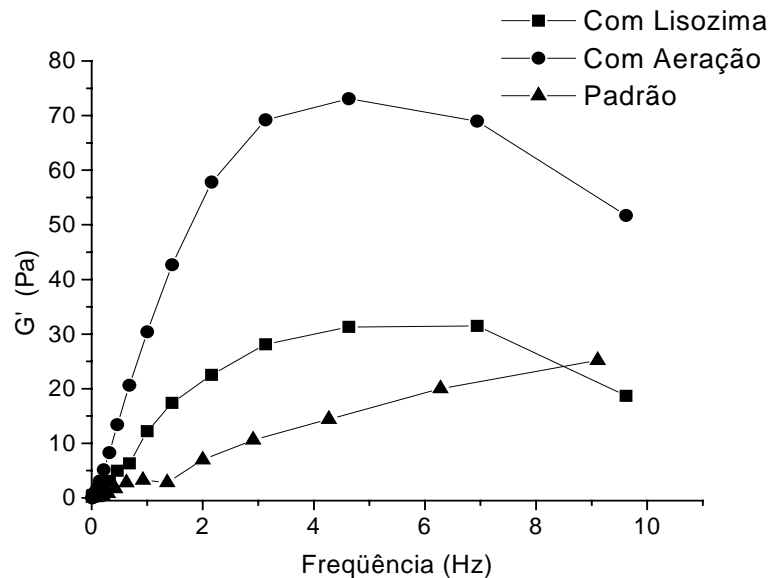


Figura 5.17: Comparação do módulo elástico G' para as soluções de AH obtidas com adição de lisozima e com aeração de 2,0 vvm.

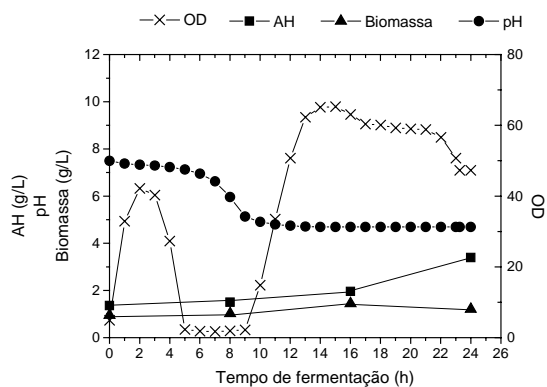
5.7. Influência da Variação nos Níveis da Aeração Forçada e Agitação

5.7.1. Análise da fermentação

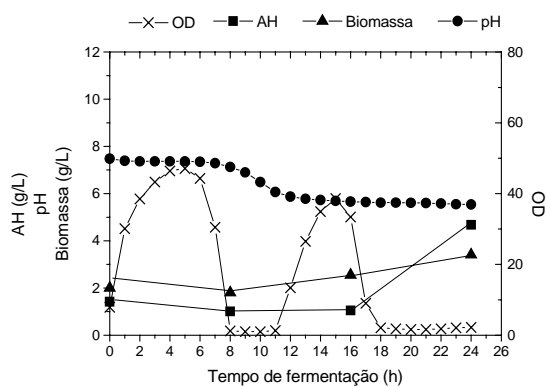
A Figura 5.18 mostra a influência das diferentes taxas de aeração e agitação, nos perfis de oxigênio dissolvido (OD), massa celular, concentrações de glicose e AH produzido pela cepa ATCC 39920.

Para o menor nível de agitação (150 rpm) as fermentações são mais controladas quando comparadas a 400 rpm. A concentração de AH aumenta de 3,31 g/L (150 rpm) para 4,70 g/L quando a aeração foi reduzida de 2,0 para 0,5 vvm. A massa celular foi maior para 0,5 vvm, enquanto que o consumo máximo de oxigênio ocorreu na fase exponencial entre os intervalos de 5 – 9 h e 8 – 11 h para a aeração de 2,0 e 0,5 vvm respectivamente (Figura 5.18 (a)). O abaixamento da OD no período de 4 a 6 h na Figura 5.18 (a) e de 8 a 10h na

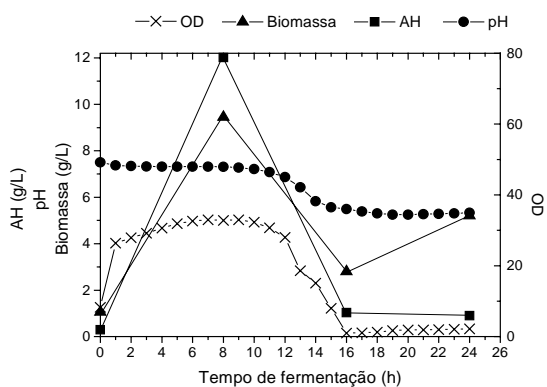
Figura 5.18 (b), deve-se provavelmente à resíduos que ficaram alojados no eletrodo durante a monitoração.



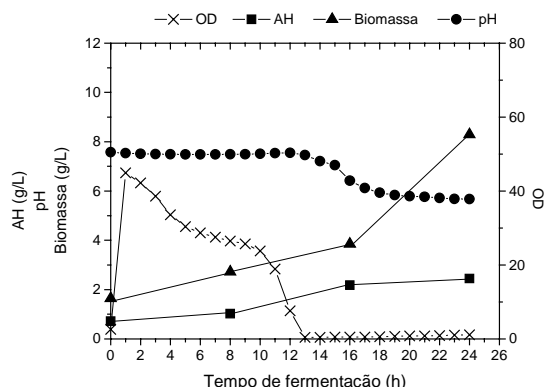
(a) 150 rpm/2,0 vvm



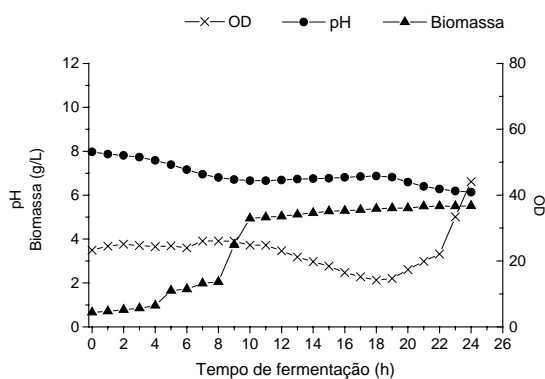
(b) 150 rpm/0,5 vvm



(c) 400 rpm/2,0 vvm



(d) 400 rpm/0,5 vvm



(e) 250 rpm/2,0 vvm

Figura 5.18: Perfis cinéticos do oxigênio dissolvido (OD), pH, biomassa e AH para as diferentes combinações.

5.7.2. Análise do comportamento reológico

A Tabela 5.10 apresenta viscosidade de cisalhamento, viscoelasticidade e massa molar do AH produzido, nas diferentes condições experimentais. Os gráficos da intersecção da viscosidade específica reduzida e viscosidade inerente versus a concentração de AH produzido por fermentação em solução de NaCl foram construídos, para o cálculo da massa molar.

Tabela 5.10: Valores de concentração, viscosidade, viscoelasticidade e massa molar para as diferentes combinações de agitação e taxa de aeração.

Agitação	AH	η_{∞}	G'	Massa Molar
Aeração	(g L⁻¹)	(cP)	(Pa)	(Da)
150rpm/2,0vvm	3,31	915	73,1	3,2 x 10 ⁶
150rpm/0,5vvm	4,70	345	24,6	1,2 x 10 ⁶
250rpm/2,0vvm	4,00	9	ausente	-
400rpm/2,0vvm	0,90	12	ausente	-
400rpm/0,5vvm	2,46	7	ausente	-

η_{∞} - Viscosidade Limite

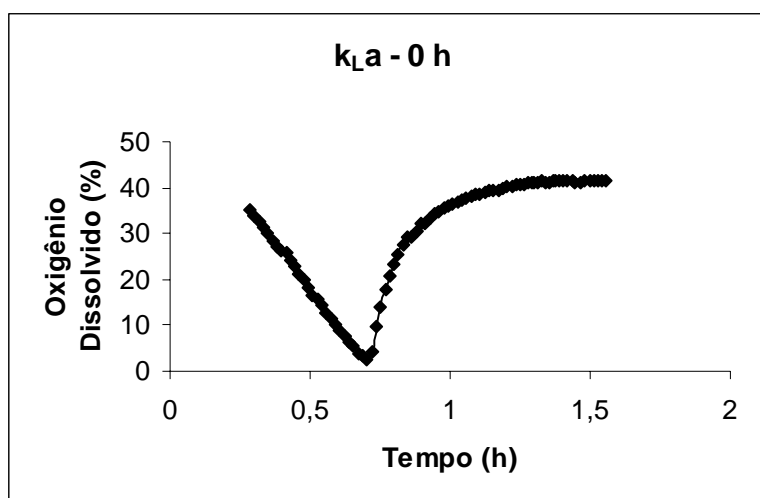
G' - Viscoelasticidade (módulo elástico)

Maiores valores de viscosidade, viscoelasticidade e massa molar foram obtidos para aeração de 2,0 vvm e 150 rpm (Tabela 5.10). Apesar de um pequeno aumento na concentração do AH quando a agitação aumentou de 150 (3,31 g/L) para 250 rpm (4,0 g/L), ocorreu uma grande diminuição nos valores da viscosidade para aeração de 2,0 vvm. Nestas condições a viscoelasticidade não foi significativa e a massa molar não pode ser determinada pelo método viscosimétrico. Para agitação de 400 rpm e aeração de 2,0 vvm a concentração de massa celular e AH atingiu o máximo em 8 h, mas decresceu nas próximas

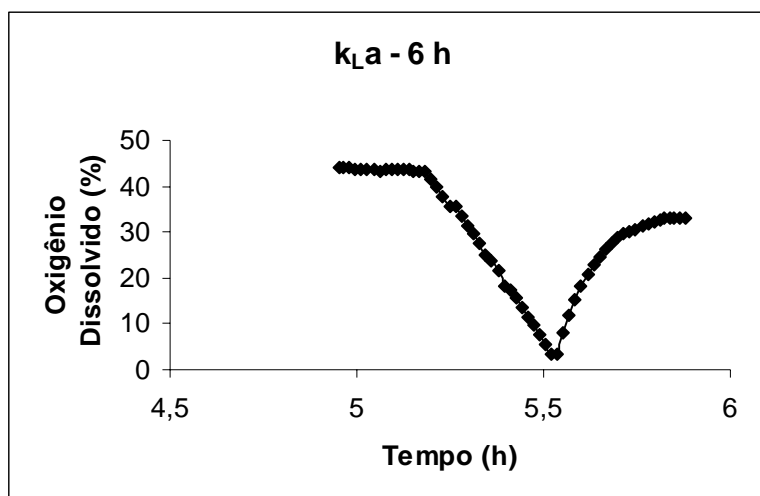
8 h. Reduzindo a aeração (0,5 vvm), a fermentação foi melhor controlada aumentando a massa celular mas diminuindo a concentração de AH (2,46 g/L). Os menores resultados obtidos a 400 rpm poderiam ser explicados pela combinação dos efeitos da toxicidade do oxigênio sobre a célula e do cisalhamento favorecido pela ação da agitação no biopolímero. Sendo assim, o oxigênio deve ser disponibilizado à célula a níveis médios de agitação e aeração para aumentar a produção e a qualidade (viscosidade e viscoelasticidade) considerando concentrações de glicose (60 g/L) e extrato de levedura (60g/L) em excesso no meio.

5.8. Requerimentos de Oxigênio e k_La ao longo da Fermentação

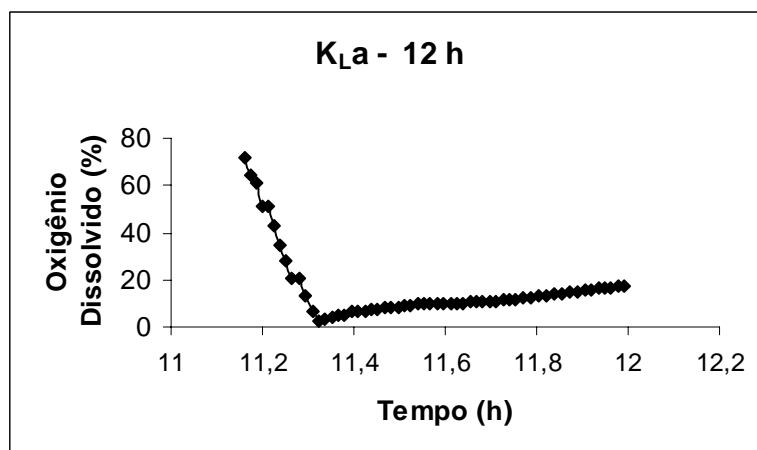
A Figura 5.19 apresenta a variação do oxigênio dissolvido em função do tempo, utilizados para o cálculo dos requerimentos de oxigênio para respiração celular, Q_{O_2} , e do k_La pelo método dinâmico. Quando a aeração é cortada, devido à respiração do microrganismo o oxigênio dissolvido no meio decresce. Realimentando o ar (antes que o oxigênio dissolvido caia abaixo do valor crítico) ocorre o aumento do oxigênio dissolvido com o tempo.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.19: Variação do oxigênio dissolvido em função do tempo (a) 2 h, (b) 6 h obtida pelo método dinâmico e (c) 12 h pelo método do balanço de oxigênio.

O k_{La} até 6 h de fermentação foi calculado pelo método dinâmico. Em 12 e 24 h, pelo baixo valor da concentração de oxigênio presente no meio, em decorrência da alta densidade celular, o k_{La} foi calculado pelo método de balanço de oxigênio.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.11, na qual os valores entre parênteses representam o k_{La} obtido pelo método do balanço de oxigênio. Observa-se nos dois primeiros casos boa concordância entre os valores obtidos por ambos os métodos.

Na mesma tabela são apresentados os requerimentos de oxigênio devido à respiração celular, Q_{O_2} . A Figura 5.20 mostra a variação do k_{La} longo da fermentação. Os resultados mostram o crescimento desse parâmetro com um máximo valor em 12 h de cultivo, o que corresponde a fase logarítmica de crescimento celular. Esse comportamento indica mudanças nas propriedades físico-químicas do meio, que devem ser melhor investigadas.

Tabela 5.11: Valores de k_{La} e dos requerimentos (R) nos tempos de 0, 6, 12 e 24 h de fermentação.

<i>Tempo (h)</i>	<i>k_{La} (s^{-1})</i>	<i>R (mg/L.h)</i>
0	0,000332 (0,000356)	6,26
6	0,000297 (0,000604)	9,28
12	(0,00436)	33,65
24	(0,000540)	12,44

Observa-se também que os baixos valores obtidos para o k_{La} refletem a branda condição de agitação usada (150 rpm) nos ensaios devido à sensibilidade do polímero aos efeitos do cisalhamento como descrito no item (5.7), influência da variação nos níveis da aeração forçada e agitação.

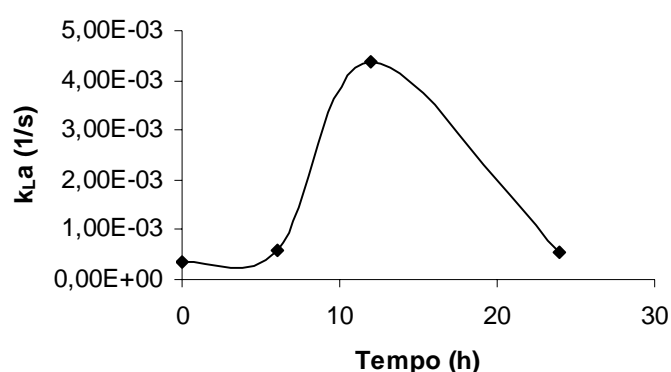


Figura 5.20: Perfil do k_{La} ao longo do tempo de cultivo para a cepa ATCC 39920.

Na Figura 5.21, os requerimentos de suprimento de oxigênio ao meio de cultura são graficados em conjunto com a variação dos outros parâmetros da fermentação.

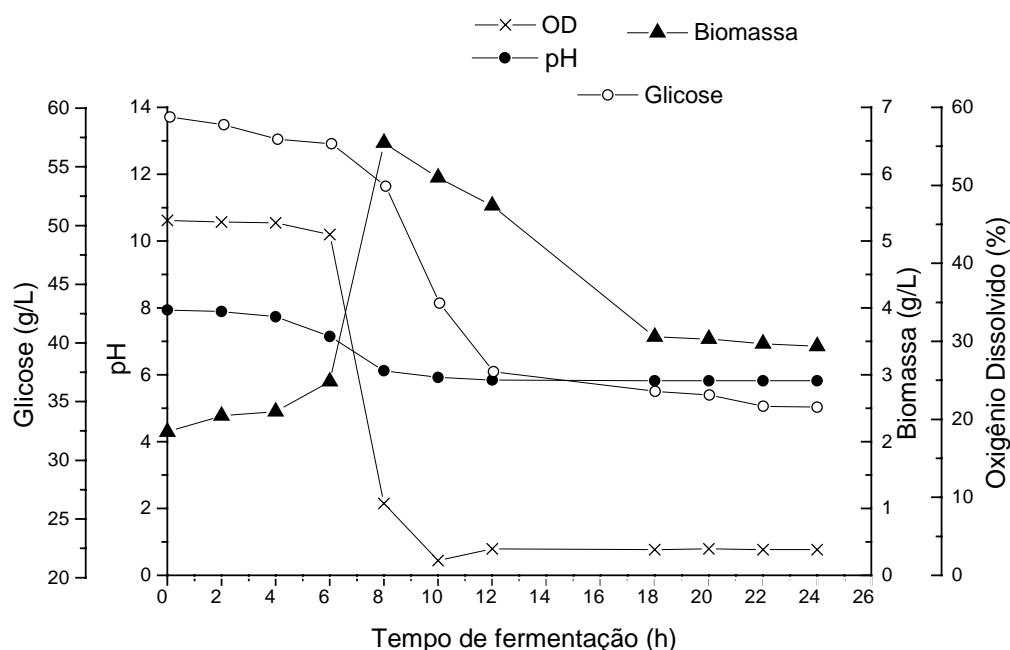


Figura 5.21: Perfis cinéticos do oxigênio dissolvido (OD), pH, concentração de biomassa e glicose em fermentação com a cepa ATCC 39920.

5.9. Efeitos da interrupção Corte da Aeração Forçada

As Figuras 5.22 (a), (b) e (c) mostram a influência da aeração contínua e do corte da aeração, em 8 e 16 h, nos perfis cinéticos do pH, OD e concentrações de substrato, massa celular e produto. A Tabela 5.12 compara os valores de concentração, viscosidade, viscoelasticidade e massa molar do biopolímero produzido. Nestes cultivos os níveis de concentração da biomassa e de AH foram diferentes dos valores obtidos nos ensaios anteriores nas mesmas condições operacionais, devido à utilização de cepas de diferentes repiques.

Para o cálculo da massa molar a viscosidade intrínseca foi determinada a partir dos valores das viscosidades específica reduzida e inerente, calculados pelas relações apresentadas na Tabela 4.4, com dados obtidos em viscosímetro capilar. Estes valores são mostrados na Tabela 5.12 e os gráficos apresentados nos anexos (E), (F) e (G).

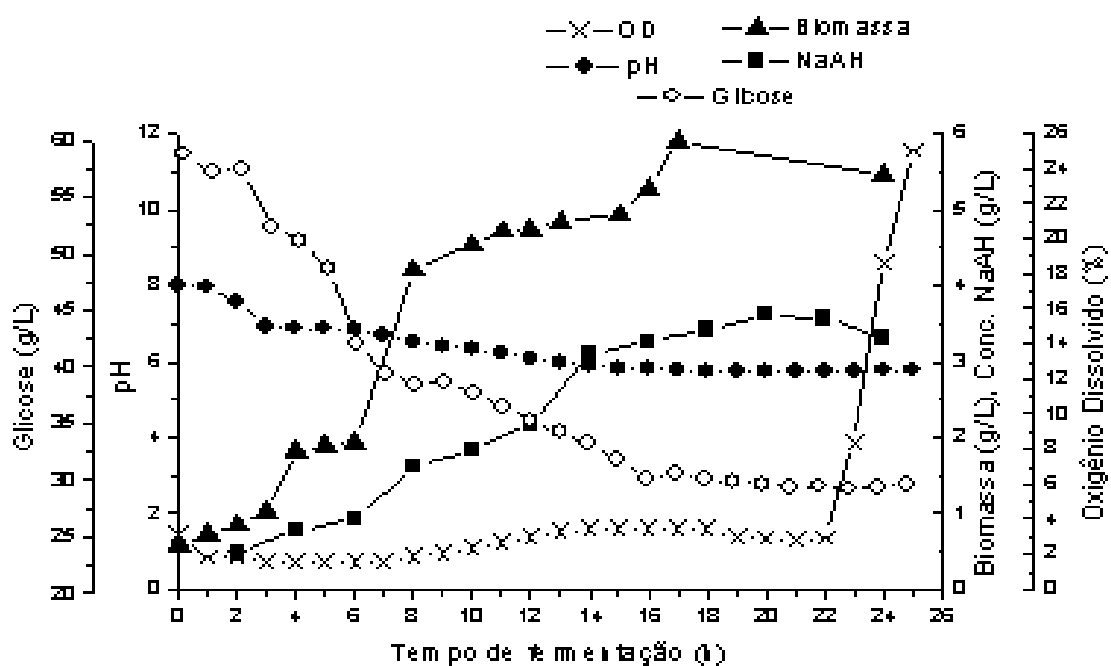
Tabela 5.12: Concentração, viscosidade, viscoelasticidade e massa molar para os processos com e sem corte de oxigênio em 24 h de cultivo.

Corte	AH (gL⁻¹)	η_{∞} (cP)	G' (Pa)	Massa Molar (Da)
16 h	3,40	823	52,6	8,5 x 10 ⁵
8 h	3,70	890	64,9	2,47 x 10 ⁶
Sem Corte	3,31	915	73,1	3,2 x 10 ⁶

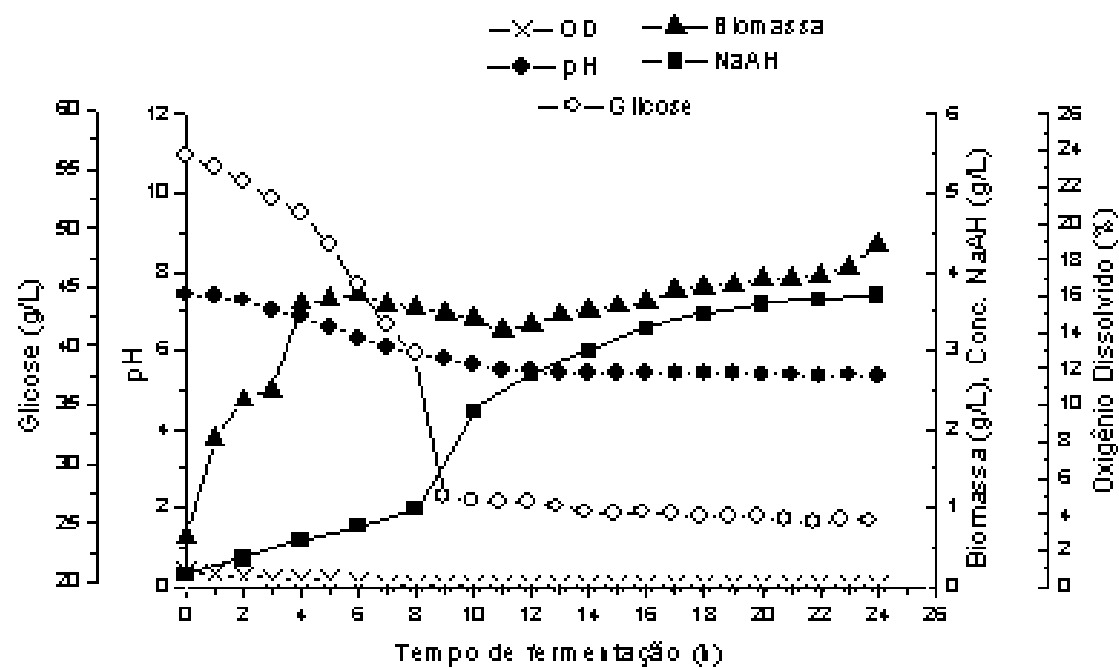
η_{∞} - Viscosidade Limite

G' - Viscoelasticidade (módulo elástico)

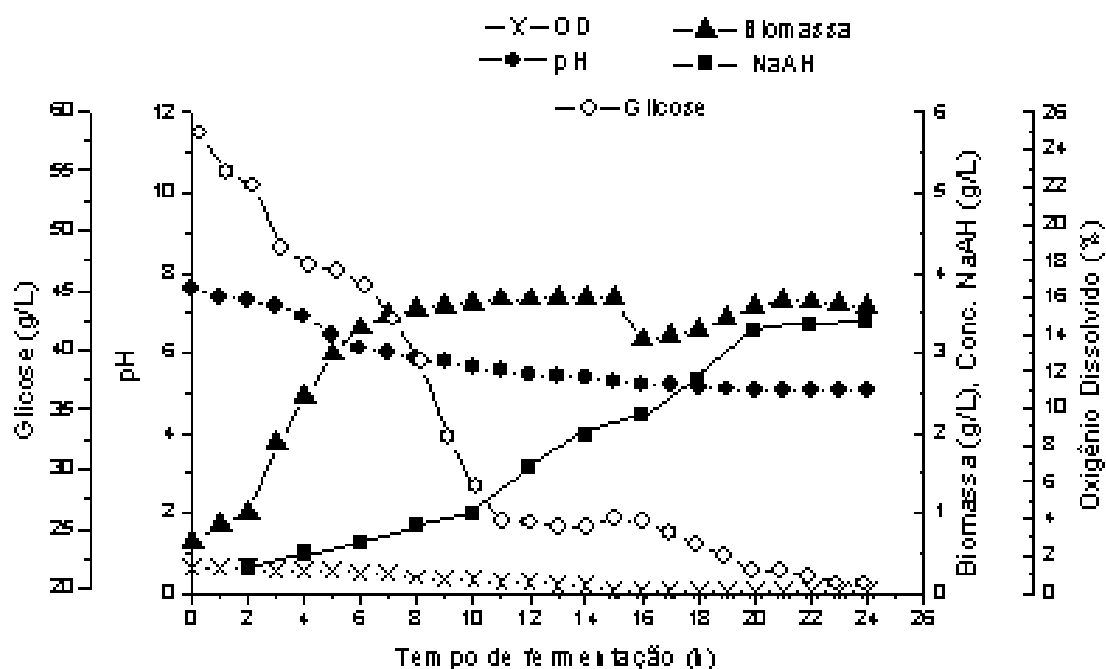
Apesar da concentração de AH obtida ser similar nos três ensaios, a interrupção da aeração em 8 e 16 h, resultou em uma redução significativa na viscosidade, viscoelasticidade e massa molar do biopolímero quando comparados ao processo com aeração contínua.



(a) Sem corte de oxigênio



(b) Corte de oxigênio em 8h



(c) Corte de oxigênio em 16h

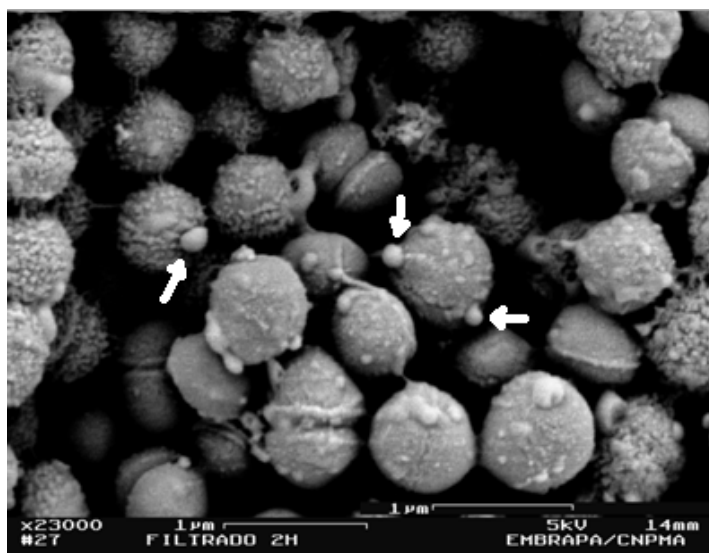
Figura 5.22: Perfis cinéticos do pH, oxigênio dissolvido e concentrações de massa celular, substrato e produto (a) sem corte de oxigênio, (b) com corte em 8 h e (c) com corte em 16h.

5.10. Caracterização da Morfologia Celular e Presença do AH na Célula

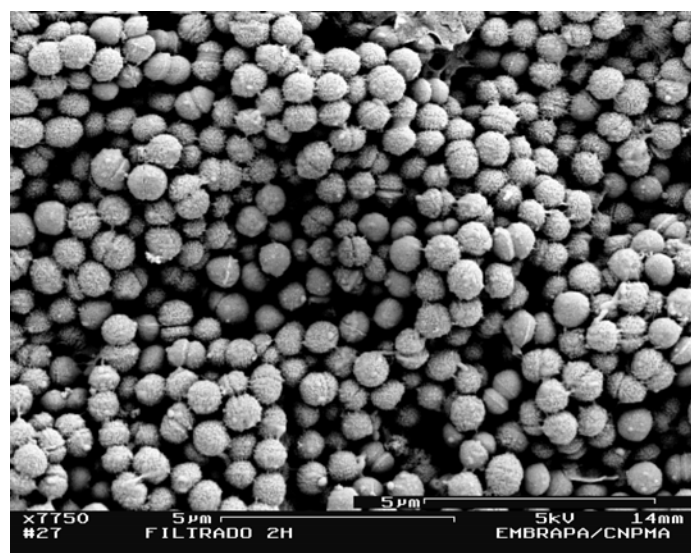
Esta caracterização foi feita em amostras retiradas no início do cultivo (2 h), no início da fase exponencial de crescimento celular (10 h) e no final da fermentação (24 h). As amostras foram filtradas e as células retidas foram fixadas, metalizadas e observadas por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 5.23 apresenta as micrografias obtidas e as características do biopolímero ao longo tempo do cultivo celular.

Observa-se que com o passar do tempo, o polímero produzido acumula-se na superfície da célula e é liberado para meio. As micrografias das Figuras 5.23 (a) e (b), mostram o acúmulo na superfície da célula, e a Figura 5.23 (c), a sua liberação para o meio, com as características de polímero muito viscoso. De acordo com os relatos da literatura, e

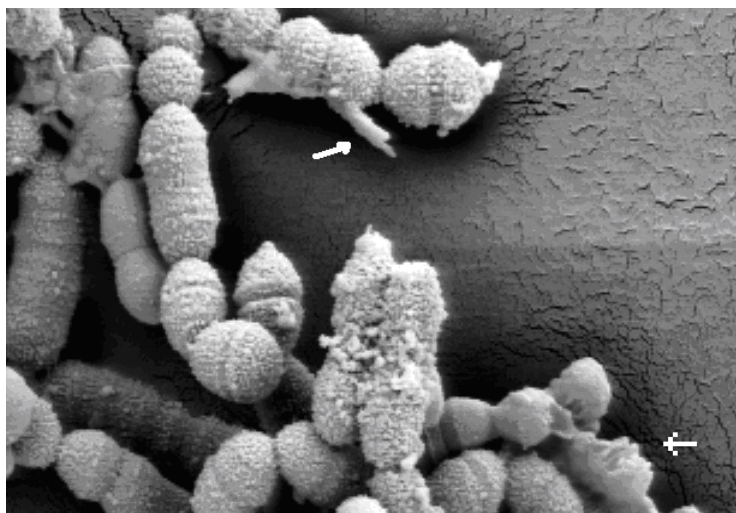
dos resultados observados no item 5.1.3, todo o AH produzido é extrudado através da membrana celular, como mostram as Figuras 5.23 (a) e (b). Portanto, não há acúmulo significativo do polímero no interior da célula. Isto representa uma vantagem grande em relação à produção de outros polímeros tais como os polialcanoatos (PHBs), que necessitam de uma etapa adicional de processo para a sua liberação do espaço intracelular. As propriedades reológicas e a massa molar também são alteradas ao longo do tempo, como poder ser observado na Figura 5.23 (c), onde as ramificações do AH livre ficam mais intensas com o passar do tempo, indicando o aumento na massa molar e conseqüentemente na sua viscoelasticidade e viscosidade.



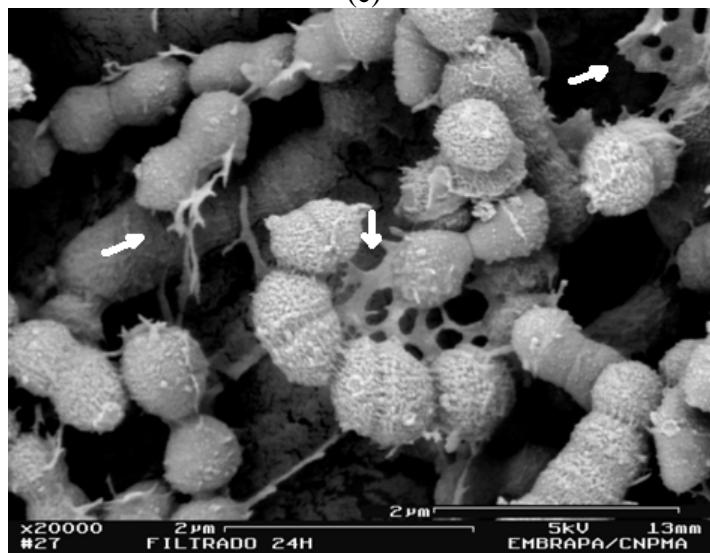
(a)



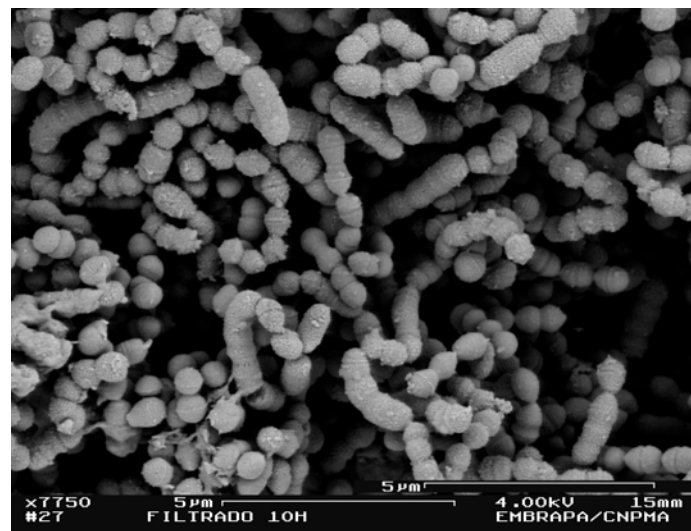
(b)



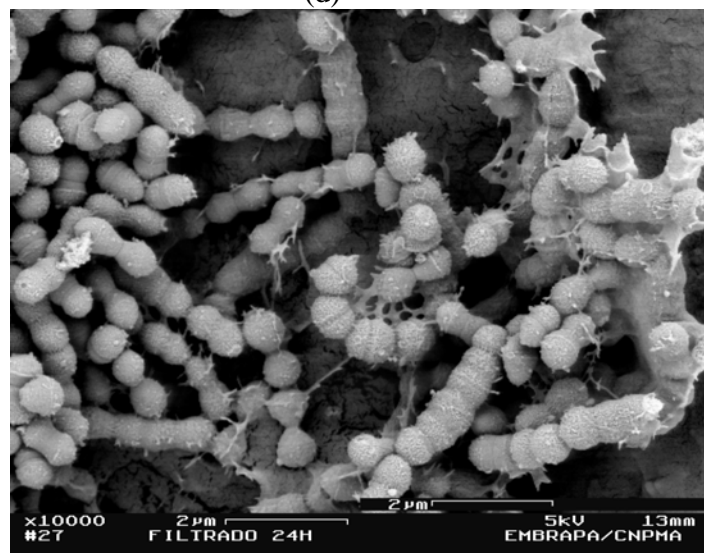
(c)



(c)



(d)



(f)

Figura 5.23: Microscopia Eletrônica de Varredura, do microrganismo *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 nos tempos de fermentação (a) e (b) 2 h, (c) e (d) 10 h e (e) e (f) 24 h. Amplificações (a)23000 X, (d) 7750 X, (c) e (f) 10000 X e (b) e (e) 20000 X.

6.0. CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados conclui-se que:

- Dentre as cepas estudadas na etapa de seleção, a mutante *S. zooepidemicus* ATCC 39920 foi a que produziu maior concentração de AH (437 mg/L) com produtividade específica (0,0153g/g.h) e volumétrica (0,0182g/L.h).
- A razão volumétrica de etanol:sobrenadante utilizada na separação e pré-purificação do AH que resultou em um maior rendimento foi de 1,5 volume de etanol:1 volume de meio.
- A adição de tensoativo no caldo de fermentação não aumentou a concentração de AH indicando que não está presente no interior da célula em quantidades significativas.
- O AH produzido em *shaker* com agitação de 150 rpm, temperatura 37°C, pH_{inicial} 7,5, na etapa de seleção, pela cepa ATCC 39920 apresentou viscosidade 518 cP, com características viscoelásticas e massa molar ($2,2 \times 10^5$ Da), .
- A esterilização não produziu mudanças significativas na viscosidade da solução de AH por um período de 15 min à 121°C, sendo portanto estas condições indicadas para a esterilização do produto.
- O efeito da concentração de extrato de leveduras no meio de fermentação foi muito mais expressivo que o da glicose para a produção de AH, viscosidade e formação de massa celular, segundo planejamento fatorial 2².
- A adição de lisozima ao meio de cultivo sob as condições de agitação de 150 rpm, temperatura 37°C, pH_{inicial} 7,5 realizada em *shaker*, decresceu a produção de AH e a

sua viscosidade em relação ao controle, porém dotou o AH produzido de propriedades viscoelásticas.

- A produção de AH foi influenciada tanto pela adição de lisozima (*shaker*) quanto pelo excesso de oxigênio proveniente da aeração forçada (Bioflo).
- O AH produzido na ausência de lisozima ou sem o oxigênio em excesso, produzido pela aeração forçada, apresentou somente propriedades viscosas.
- A aeração de 2,0 vvm em reator Bioflo, agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C, pH_{inicial} 7,5 aumentou a produção do AH e as suas características viscosas e viscoelásticas.
- A massa molar ($2,2 \times 10^5$ Da) e a viscosidade (518 cP) da solução obtida sem oxigênio (*shaker*) e condições de agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C, pH_{inicial} 7,5, foram menores que a massa molar ($3,2 \times 10^6$ Da) e a viscosidade (890 cP) obtida para a solução com aeração de 2,0 vvm em reator Bioflo, agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C, pH_{inicial} 7,5.
- A fermentação com aeração de 2,0 vvm em reator Bioflo, agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C, pH_{inicial} 7,5, confere à solução a componente elástica G', ou seja, viscoelasticidade a qual aumenta com o tempo de cultivo.
- A aeração e agitação influenciam fortemente na concentração e características reológicas. A aeração de 2,0 vvm aumentou a produção do AH e as suas características viscosas e viscoelásticas, sendo assim, o oxigênio deve ser disponibilizado à célula a níveis baixos de agitação (150 rpm) e médios aeração (2,0 vvm).

- O corte da aeração em 8 e 16 h, em reator Bioflo, agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C, pH_{inicial} 7,5, resultou em uma redução significativa na viscosidade, viscoelasticidade e massa molar do biopolímero quando comparados ao processo com aeração contínua nas mesmas condições operacionais.
- A morfologia celular indicou a presença do polímero na superfície da célula e a sua liberação para o meio com o passar do tempo de cultivo.
- Os resultados demonstram a viabilidade da produção do AH de elevada massa molar por fermentação submersa utilizando cepas de *Streptococcus zooepidemicus*.

7.0. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Avaliação do efeito de outras fontes de nitrogênio na produção e características do AH.
2. Avaliação do efeito do oxigênio puro e de ar enriquecido na produção e características do AH.
3. Investigação da relação entre os intermediários ácido acético e ácido láctico e os precursores ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil-glicosamina (GlcNAc) e AH produzido.
4. Estudo dos efeitos difusivos dos nutrientes e do oxigênio o longo da fermentação.

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBISCHER, P., GODDARD, M., MOLDAUER, J. G., MULHAUSER, P. J., RATHBUN, A. M., SANBERG, P. R., VASCONCELLOS, A. V., WARNER, N. F. Implantable Therapy System and Methods. United States Patent n. 6,179,826. January 30, 2001.

AKASAKA, H., KOMASAKI, H., ARAI, T. Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid. United States Patent n. 4,801,539. January 31, 1989.

ALTMAN, R. D., ROLAND, M. A randomized clinical trial of intra-articular sodium hyaluronate in patients with osteoarthritis of the knee. American Journal of Orthopedics. v.28, n.11, 1999.

ARMSTRONG, D. C., JOHNS, M. R. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produces by *Streptococcus zooepidemicus*. Applied and Enviromental Microbiology. v.63, n.7, p. 2759-2764, July 1997.

ARMSTRONG, D. C., COONEY, M. J., JOHNS, M. R. Growth and Amino Acid Requirements of Hyaluronic Acid Producing *Streptococcus zooepidemicus*. Applied Microbiology Biotechnology. v.47, p.309-312, 1997.

ARMSTRONG, D. C., JOHNS, M. R. Improved Molecular Weight Analysis of Streptococcal Hyaluronic Acid by Size Exclusion Chromatography. Biotechnology Techniques. v.9, n.7, p.491-496, July 1995.

BORZANI, W., AQUARONE, E., LIMA, U. A., SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. Editora Edgard Blucher Ltda. Volume 2. 1ª Edição 2001.

- BRANDT, K. D.; MICHALSKI, J.; BLOCK, J. A.; CALDWELL, J. R. Clinical Experience with Orthovisc in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee. Anika Therapeutics. 1999.
- BROWN, K. K., RUIZ, L. C., RINJ, I. Ultrapure Hyaluronic Acid and Method of Making It. United States Patent n. 4,782,046. November 1, 1988.
- CHONG, B.F., BLANK, L. Metabolic Engineering of Hialuronic Acid Production. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998.
- CHONG, B. F., NIELSEN, L. K. Aerobic Cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the Role of NADH oxidase. Journal Biochemical Engineering. v.16, p.153-162, 2003. (a)
- CHONG, B. F., NIELSEN, L. K. Amplifying the Cellular Reduction Potential of *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Biotechnology. v.100, p.33-41, 2003. (b)
- CHONG, B. F.; BLANK L.M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L.K., Microbial Hyaluronic acid production, Applied Microbiology and Biotechnology. v.66, n.4, p.341-351, January 2005.
- DISCHE, Z. A new specific color reaction of Hexuronic Acids. Journal of Biological Chemistry. v.167, p.189-198, 1946.
- DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Principles. Edition Academic Press, 1995, 417 p.
- DOUGHERTY, B., A., RIJN, I. Molecular Characterization of hasB from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group a Streptococci. Journal of Biological Chemistry. V.268, n.10, p.7118-7124. April, 1993.

ELLWOOD, D. C., EVANS, C. G. T., DUNN. G. M., MCINNES, N., YEO, R. G., SMITH, K. J. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent n. 5,411,874. May 2, 1995.

ELLWOOD, D. C., EVANS, C. G. T., DUNN. G. M., MCINNES, N., YEO, R. G. Production of Hyaluronic Acid. United States Patent n.5,563,051. October 8,1996.

GOLDENHEIM, P., LACOUTURE, P., DONIGI-GALE, D., CHASIN, M., SACKLER, R. Prolonged Anesthesia in Joints and Body Spaces. United States Patent n.6,248,345. June 19, 2001.

GÓMEZ-ALEJANDRE, S., SÁNCHEZ, E., ABRADELO, C., REY-STOLLE, M. F., HERNÁNDEZ-FUENTES, I. Partial Specific Volume of Hyaluronic acid in Diferent media and conditions. International Journal of Biological Macromolecules. v.27, p.287-290, 2000.

HABASSED, X. Drugs of Today. Supl.6: 1-21, 1997.

HANEY, A.F., DOTY, E. A Barrier Composed of Chemically Cross-linked Hialuronic Acid (Incert) Reduces Postoperative Adhesion Formation. Fertility and Sterility. v.70, n.1, p.145-151, July, 1998.

HOLMSTRÖM, B., RICICI, J. Production of Hyaluronic Acid by a *Streptococcal* Strain in Batch Culture. Applied Microbiology. v.15, p.1409-1413, 1967.

HUMPHREY, A.E., TAGUCHI,H. Dynamic Measurement of Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems. Journal Ferm. Technol. V.44, n.12, p.881-889, 1966.

JERNBERG, G. R. Surgical Implant and Method for Controlled Release of Chemotherapeutic Agents. United States Patent n. 5,290,271. March 1, 1994.

- JOHNS, M. R.; GOH, L.; OEGGERLI, A. Effect of pH, Agitation and Aeration on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnology Letters. v.16, n.5, p.507-512, May 1994.
- KENDALL, F.E., HEIDELBERGER, M., DAWSON, M. H. A Serologically Inactive Polysaccharide Elaborated by Mucoïd Strains of group A Hemolytic *Streptococcus*. Journal of Biological Chemistry. v.118, p.61-69, 1937.
- KIM, J., YOO, S., OH, D., KWEON, Y., PARK, D., LEE, C., GIL, G. Selection of a *Streptococcus equi* Mutant and Optimization of Culture Conditions for the Production of High Molecular Weight Hyaluronic Acid. Enzyme and Microbial Technology. v.19, p.440-445, 1996.
- LEHNINGER, A. L. Princípios de Bioquímica. Editora Sarvier, SP, 219p., 1988.
- MORRIS, E. R.. The Structure, Dynamics and Equilibrium Proprieties of Colloidal Systems. London: Nato Scientific, p. 449-470, 1990.
- MORRISON, ROBERT, BOYD. Química Orgânica. Ed. Fundação Calouse Guebenkian, Lisboa, p.500, 1984.
- NAVARRE, W. W., SCHNEEWING, O. Surface Proteins of GramPositive Bacteria and Mechanisms of their Targeting to the Cell Wall Envelope. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v.63, n.1, p. 174-229, March 1999.
- NIMROD, A., GREENMAM, B., KANNER, D., LANDSBERG, M., BECK, Y. Method of Production High Molecular Weight Sodium Hyaluronato by Fermentation of *Streptococcus*. United States Patent n. 4,780,414. October 25,1988.
- NOLL, C. R., NOLL, V. M. Protective Skin Composition. United States Patent n. 5,725,875. March 10, 1998.

- OGRODOWSKI, C. S., SANTANA, M. H. A., HOKKA, C. O. Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus*. Applied Biochemistry and Biotechnology. V.121-124, p.753-761,2005.
- PARDOLL, D., AZHARI; R., LEONG; K. W., GOLUMBE; P. K., JAFFE, E., LEVITSKY, H., LAZENBY, A. Controlled Release of Pharmaceutically Active Substances for Immunotherapy. United States Patent n. 6,193,970. February 27, 2001.
- RIJN, I., KESSLER, R. E. Growth Characteristics of Group A *Streptococci* in a New Chemically Defined Medium. Infection and Immunity. v.27, p.445-448, 1980.
- ROBERTS, I. S., SAUNDERS, F. K., BOULNOIS, G. J. Biochemical Society Transactions. v.17, p.462-464, 1989.
- ROSEMAN, S., MOSES, F. E., LUDOWIEG, J., DORFMAN, A. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Group A *Streptococcus*. Journal of Biological Chemistry. v.203, p.213-225, 1953.
- SAWYER, DONALD, T.; HEINEMAN; WILLIAM, R. Chemistry Experiments for Instrumental Methods, Ed. John Wiley e Sons, p. 361-379, 1984.
- SCHRAMM, G; A Practical Approach to Rheology and Rheometry. Germany, 1994.
- SEASTONE, C. V. The virulence of group C hemolytic streptococci of animal origin. Journal Exptl. Med. v.70, p.361-378, 1939.
- ST.ANG.HL, S. Method and Means for the Production of Hyaluronic Acid. United States Patent n. 6,090,596. July 18, 2000.
- STOOLMILLER, A. C.; DORFMAN A. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by *Streptococcus*. Journal of Biological Chemistry. v.244, n.2, p.236-246, 1969.

- SUHONEN, J., SCHUG, J. Medical Implant. United States Patent n. 6,132,214. October 17, 2000.
- SUZUKI, M., ISHGAKI, K., OKADA, M., ONO, K., KASAI, S., IMAMORI, K. Intra-articular Preparation for the Treatment of Arthropathy. United States Patent n. 6,197,326. March 6, 2001.
- THONARD, J. C., MIGLIORE, S. A., BLUSTEIN, R. Isolation of Hyaluronic Acid from Broth Cultures of *Streptococci*. Journal of Biological Chemistry. v.239, p.726-728, 1963.
- VOET, D. Biochemistry, Ed. John Wiley e Sons, p. 81-94, 1990.
- WARREN, G. H., GRAY, J. Isolation and purification of streptococcal hyaluronic acid. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. v.102, p.125-127, 1959.
- WEIGEL, P.H., HASCALL, V.C; TAMMI, M. Hialuronan Synthases. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Minireview. v.272, n.22, p. 13997-14000, May 30, 1997.
- WOOLCOCK, J.B. The Capsule of *Streptococcus equi*. Journal of Gen. Microbiol. v.85, p.372-375, 1974.

ANEXOS

(A) Concentrações de massa celular, substrato e produto AH para as cepas de *Streptococcus*: ATCC 39506, 6580 e 39920.

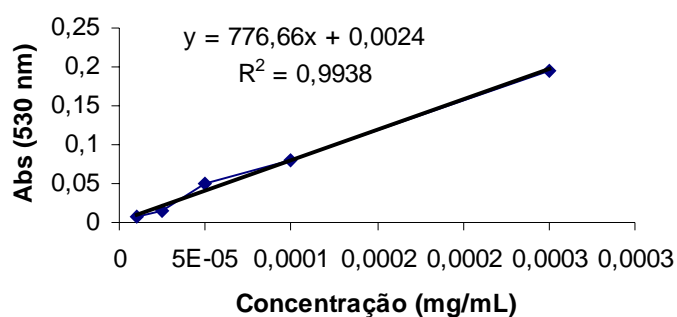
Ensaio (h)	ATCC 39506			ATCC 6580			ATCC 39920		
	X	S	P	X	S	P	X	S	P
0	0,525	40	0	0,545	40	0	0,600	40	0
2	0,56	38,33	102	0,790	29,18	123	0,605	38,26	102
4	0,615	37,54	125	0,880	28,03	138	1,290	37,68	112
6	0,695	37,81	132	2,44	25,67	156	1,525	32,12	120
8	0,725	30,46	138	0,805	24,62	115	1,470	31,98	132
10	0,935	-	146	1,517	23,88	94	1,500	31,14	148
12	0,865	-	256	-	-	-	1,200	31,25	228
14	0,915	16,49	-	-	-	-	1,110	30,55	372
24	1,115	1,5	257	1,015	19,00	67	1,190	30,93	437

X = Massa celular seca (g/L)

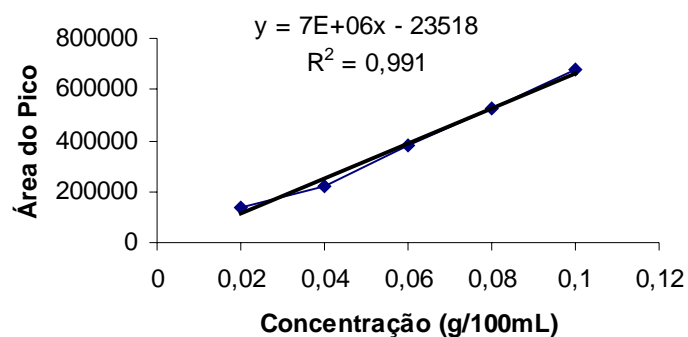
S = Concentração de glicose (g/L)

P = Concentração de ácido hialurônico (mg/L)

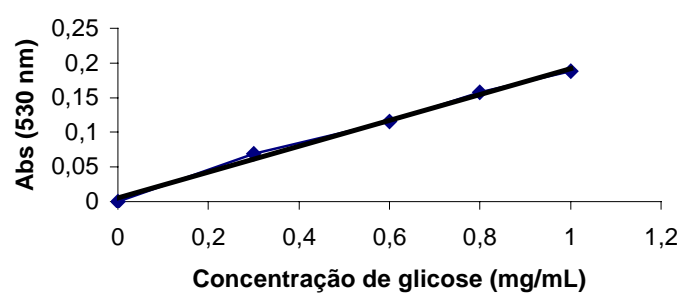
(B) Curva padrão para determinação da concentração de AH (Método Colorimétrico de Carbazol)



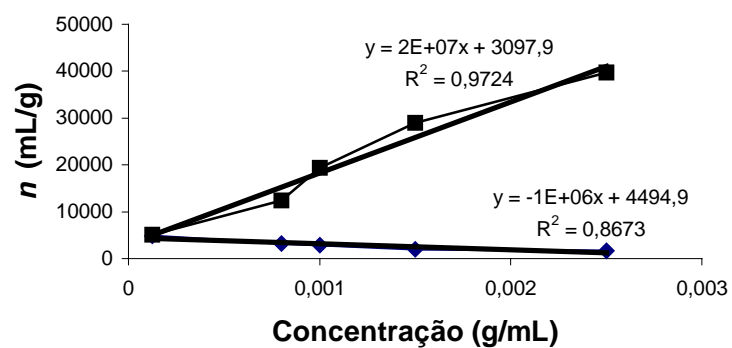
(C) Curva padrão para determinação da concentração de NaAH (HPLC)



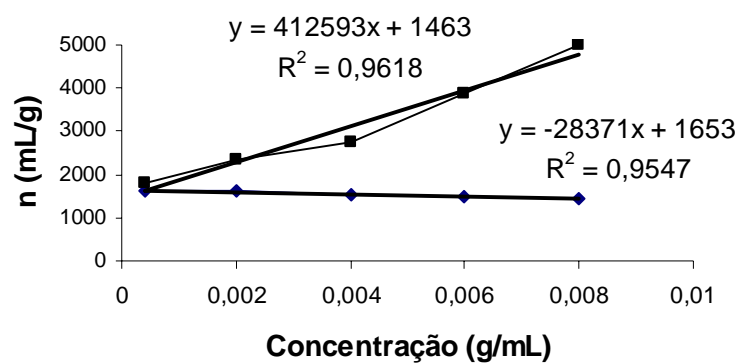
(D) Curva padrão para determinação da concentração de glicose



(E) Viscosidade específica reduzida e viscosidade inerente versus a concentração de AH produzido por fermentação em solução de NaCl, com aeração de 2,0 vvm, sem corte.



(F) Viscosidade específica reduzida e viscosidade inerente versus a concentração de AH produzido por fermentação em solução de NaCl, com aeração de 2,0 vvm e corte em 16 h de cultivo.



(G) Viscosidade específica reduzida e viscosidade inerente versus a concentração de AH produzido por fermentação em solução de NaCl, com aeração de 2,0 vvm e corte em 8 h de cultivo.

